



Organisation des Nations Unies
pour l'alimentation
et l'agriculture



Convention internationale pour la protection des végétaux
Protéger les ressources végétales contre les organismes nuisibles

NORMES INTERNATIONALES POUR LES MESURES PHYTOSANITAIRES 27

PROTOCOLES DE DIAGNOSTIC

NIMP 27
ANNEXE 16

FRE

PD 16: Genre *Liriomyza*

Produit par le Secrétariat de la Convention internationale
pour la protection des végétaux (CIPV)

Cette page est intentionnellement laissée vierge

NIMP 27

Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés

PD 16: Genre *Liriomyza*

Adopté en 2016; publié en 2016

TABLE DES MATIÈRES

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Informations relatives à l'organisme nuisible..... | 3 |
| 2. | Données taxonomiques | 4 |
| 3. | Détection | 5 |
| 3.1 | Collecte et conservation de spécimens | 6 |
| 3.1.1 | Collecte d'adultes | 7 |
| 3.1.2 | Collecte de stades de développement immatures..... | 7 |
| 4. | Identification | 7 |
| 4.1 | Identification morphologique d'un adulte de <i>Liriomyza</i> | 8 |
| 4.1.1 | Préparation des génitalia d'un adulte mâle de <i>Liriomyza</i> pour examen au microscope ... | 8 |
| 4.1.1.1 | Détermination du sexe des mouches..... | 8 |
| 4.1.1.2 | Préparation du distiphallus du mâle pour examen | 8 |
| 4.1.2 | Identification de la famille des Agromyzidae | 9 |
| 4.1.3 | Identification du genre <i>Liriomyza</i> | 10 |
| 4.1.4 | Identification des espèces de <i>Liriomyza</i> | 11 |
| 4.1.4.1 | Caractères morphologiques des adultes de <i>Liriomyza</i> spp. | 11 |
| 4.1.4.2 | Structure distiphallique des adultes mâles de <i>Liriomyza</i> spp..... | 14 |
| 4.1.4.3 | Caractéristiques morphologiques des stades immatures des quatre espèces de <i>Liriomyza</i> visées..... | 15 |
| 4.2 | Identification moléculaire des espèces de <i>Liriomyza</i> | 15 |
| 4.2.1 | Témoins des analyses moléculaires | 16 |
| 4.2.2 | Extraction de l'ADN | 16 |
| 4.2.3 | Identification par PCR-PLFR des quatre espèces visées | 16 |
| 4.2.3.1 | Amplification du gène de la COII..... | 17 |
| 4.2.3.2 | Digestion par enzymes de restriction et séparation des produits | 17 |
| 4.2.4 | Amorces PCR spécifiques pour les espèces, permettant l'identification des quatre espèces visées | 18 |
| 4.2.4.1 | Amplification du gène de la COI..... | 19 |
| 4.2.5 | Distinction entre les espèces cryptiques <i>L. langei</i> et <i>L. huidobrensis</i> | 20 |
| 4.2.5.1 | PCR-PLFR..... | 20 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.2.5.2 | Comparaison de séquences d'ADN | 20 |
| 4.2.6 | «Codes-barres» de l'ADN | 21 |
| 5. | Données à conserver..... | 21 |
| 6. | Points de contact pour tout complément d'informations | 21 |
| 7. | Remerciements | 22 |
| 8. | Bibliographie..... | 22 |
| 9. | Figures..... | 25 |

1. Informations relatives à l'organisme nuisible

La famille des Agromyzidae est une famille de petites mouches dont les larves, souvent mineuses des feuilles et mineuses des tiges, se nourrissent des tissus internes des végétaux. La majorité des espèces d'agromyzides sont, soit spécifiques d'un seul hôte, soit associées à un petit groupe d'hôtes, composé de végétaux apparentés. Cependant, quelques espèces très polyphages sont devenues des organismes nuisibles agricoles et horticoles dans de nombreuses régions du monde. Il s'agit notamment de quatre espèces de *Liriomyza* qui sont énumérées dans la législation de divers pays relative à la quarantaine des végétaux: *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* et *L. trifolii*. Toutes sont des organismes nuisibles polyphages de cultures ornementales et légumières. Dans le présent protocole, l'identification au niveau de l'espèce ne concerne que ces quatre espèces.

Liriomyza est principalement présente dans la zone tempérée septentrionale mais certaines espèces sont également observées dans les régions afrotropicale, néotropicale et orientale. Les mouches adultes des plus de 300 espèces de *Liriomyza* se ressemblent beaucoup: elles sont petites (1 à 3 mm de longueur) et, vues de dessus, apparaissent essentiellement noires avec, chez la plupart des espèces, un front et un scutellum jaunes (par exemple, Figure 1). En conséquence, il peut s'avérer difficile de séparer les espèces appartenant à ce genre. En outre, pour déterminer les quatre espèces concernées par la quarantaine, la personne chargée de la diagnose doit non seulement distinguer ces quatre espèces entre elles mais aussi les distinguer de la faune ambiante pertinente des espèces de *Liriomyza* autochtones.

L. bryoniae est essentiellement une espèce du Paléarctique, qui a été signalée partout en Europe et en Asie et de l'Égypte au Maroc en Afrique du Nord (CAB International, 2013). Elle est très polyphage et a été observée sur 16 familles de végétaux (Spencer, 1990). C'est un organisme nuisible à la tomate, aux cucurbitacées (notamment melon, pastèque et concombre) et à la laitue, aux haricots et aux lupins produits sous serre (Spencer, 1989, 1990).

L. huidobrensis serait originaire d'Amérique du Sud et s'est disséminée depuis dans la plupart des régions du monde, notamment certaines parties d'Amérique du Nord, d'Europe, d'Afrique, d'Asie et du Pacifique (Lonsdale, 2011; CAB International, 2013). Cependant, l'espèce telle qu'elle était antérieurement définie sur le plan taxonomique a été récemment scindée en deux espèces morphocryptiques – *L. huidobrensis* et *L. langei* – dont les aires de répartition relatives sont définies avec une certaine incertitude. Actuellement, la présence de *L. langei* n'a été confirmée qu'aux États-Unis et il est très probable que toutes les populations envahissantes présentes hors des États-Unis appartiennent à l'espèce *L. huidobrensis* telle qu'elle est désormais définie sur le plan taxonomique (Scheffer et Lewis, 2001; Scheffer *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2008; Lonsdale, 2011). *L. huidobrensis* est très polyphage et a été signalée sur 14 familles de végétaux (Spencer, 1990). Les principales cultures d'importance économique attaquées par cette espèce sont la betterave sucrière, l'épinard, les pois, les haricots, la pomme de terre et certains végétaux ornementaux (*Gypsophila* le plus souvent et, plus rarement, œillets et chrysanthèmes) (Spencer, 1989).

L. sativae est originaire d'Amérique du Nord, d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud et s'est disséminée depuis dans de nombreuses régions d'Asie, d'Afrique et du Pacifique, mais ni en Europe ni en Australie (Lonsdale, 2011; CAB International, 2013). Cependant, les notes relatives à la répartition de *L. sativae* sont susceptibles d'être incomplètes car un certain nombre d'éléments indiquent que son aire de répartition continue de s'étendre rapidement. Il s'agit d'un autre organisme nuisible particulièrement polyphage s'attaquant à de nombreuses cultures légumières et florales (Spencer, 1973, 1990). L'espèce a été signalée sur neuf familles de végétaux, mais on l'observe essentiellement sur des hôtes appartenant aux Cucurbitaceae, aux Fabaceae et aux Solanaceae (Spencer, 1973, 1990).

L. trifolii, également originaire d'Amérique du Nord, d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud, a été disséminée dans de vastes régions d'Europe, d'Afrique, d'Asie et du Pacifique, très probablement en conséquence du commerce de boutures de chrysanthèmes (Martinez et Etienne, 2002; Lonsdale, 2011; CAB International, 2013). L'espèce est très polyphage et a été observée sur 25 familles de végétaux (Spencer, 1990). Les principales cultures d'importance économique attaquées par cette espèce sont les suivantes: haricots, céleri, chrysanthèmes, concombre, gerberas, *Gypsophila*, laitue, oignon, pomme de terre et tomate (Spencer, 1989).

Le protocole de diagnostic concerne une cinquième espèce, *L. strigata*, car celle-ci est étroitement apparentée à la fois à *L. bryoniae* et à *L. huidobrensis* et, à ce titre, constitue une espèce que la personne chargée de la diagnose doit pouvoir éliminer lorsqu'elle cherche à identifier les quatre espèces d'organismes de quarantaine. *L. strigata* est une espèce eurasiennne (Pitkin *et al.* (non daté) citant Spencer (1976), Dempewolf (2001), Ellis (2013) et Pape *et al.* (2013)). La limite orientale de son aire de répartition n'est pas clairement définie, mais l'espèce est présente au-delà de l'Oural (Spencer, 1976) et son observation en Asie du Sud-Est suscite quelques doutes (Dempewolf, 2004). Elle est très polyphage puisqu'elle a été signalée sur 29 familles de plantes dans le monde entier (Spencer, 1990).

2. Données taxonomiques

Nom: *Liriomyza* Mik, 1894

Synonymes: *Agrophila* Lioy, 1864, *Antineura* Melander, 1913, *Haplomyza* Hendel, 1914, *Praspedomyza* Hendel, 1931, *Craspedomyza* Enderlein, 1936, *Triticomyza* Blanchard, 1938,

Classement taxonomique: Insecta, Diptera, Agromyzidae, Phytomyzinae

Nom: *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach, 1858)

Synonymes: *Liriomyza solani* Hering, 1927; *Liriomyza hydrocotylae* Hering, 1930; *Liriomyza mercurialis* Hering, 1932; *Liriomyza triton* Frey, 1945; *Liriomyza citrulli* Rohdendorf, 1950; *Liriomyza nipponallia* Sasakawa, 1961

Nom commun: Mouche mineuse des feuilles de tomate

Nom: *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926)

Synonymes: *Liriomyza cucumifoliae* Blanchard, 1938; *Liriomyza decora* Blanchard, 1954; *Liriomyza dianthi* Frick, 1958

La relation taxonomique entre *L. huidobrensis* (Blanchard) et *L. langei* Frick est complexe. *L. huidobrensis* a été décrite pour la première fois à partir de spécimens prélevés sur *Cineraria* en Argentine par Blanchard (1926). Frick (1951) a décrit *L. langei* à partir de spécimens de Californie, comme une espèce dont il indiquait qu'elle était essentiellement un organisme nuisible aux pois mais qu'elle causait aussi des dégâts sur *Aster*. En 1973, Spencer a rendu les deux espèces synonymes puisqu'elles étaient (et de facto sont encore) impossibles à distinguer sur le plan morphologique. À la suite d'une étude de leurs séquences d'ADN mitochondrial et nucléaire (Scheffer, 2000; Scheffer et Lewis, 2001), dont les résultats ont été confortés par des expériences d'élevage ultérieures (Takano *et al.*, 2008), les deux espèces ont été officiellement séparées en deux espèces cryptiques (Lonsdale, 2011). Le nom *L. langei* Frick a été rétabli à part entière et appliqué aux espèces cryptiques de Californie, et le nom

L. huidobrensis (Blanchard) a été appliqué aux espèces cryptiques d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale.

Lonsdale (2011) a tenté de déterminer des caractères morphologiques utiles à la diagnose qui pourraient permettre de différencier «la plupart» des spécimens des deux espèces mais, après avoir constaté que les caractères étaient subtils et pouvaient coïncider partiellement, a recommandé de recourir autant que possible aux données moléculaires pour appuyer l'identification. Scheffer et ses collaborateurs considèrent qu'il n'y a pas de chevauchement entre les aires de répartition des deux espèces (Lonsdale (2011) a signalé la présence de *L. huidobrensis* en Californie, une fois en 1968 et une fois en 2008, mais a précisé qu'aucun élément connu n'indiquait que des populations s'y étaient établies), et que toutes les populations envahissantes qu'ils avaient étudiées étaient des populations de *L. huidobrensis* ainsi définies (Scheffer et Lewis, 2001; Scheffer *et al.*, 2001). Cela signifie que, dans la bibliographie, les rapports sur la Californie antérieurs aux documents de Scheffer doivent presque certainement être considérés comme s'appliquant à *L. langei*. *L. langei* est essentiellement une espèce californienne, bien qu'elle ait apparemment été introduite à Hawaï dans l'Oregon et dans l'État de Washington; les populations observées en Floride, dans l'Utah et en Virginie au milieu des années 1990 ne s'y sont pas établies (Lonsdale, 2011). Seule la présence au Mexique de *L. huidobrensis* a été confirmée (Lonsdale, 2011), mais Takano *et al.* (2005) ont signalé que des spécimens de *L. langei* (décrits sous le nom de clade californien) avaient été interceptés dans un site d'inspection japonais sur des légumes frais provenant du Mexique.

Nom commun: mouche mineuse sud-américaine

Nom: *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938

Synonymes: *Agromyza subpusilla* Frost, 1943; *Liriomyza verbenicola* Hering, 1951; *Liriomyza pullata* Frick, 1952; *Liriomyza canomarginis* Frick, 1952; *Liriomyza minutiseta* Frick, 1952; *Liriomyza propepusilla* Frost, 1954; *Liriomyza munda* Frick, 1957; *Liriomyza guytana* Freeman, 1958; *Lemurimyza lycopersicae* Pla et de la Cruz, 1981.

Nom commun: mineuse maraîchère

Nom: *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)

Synonymes: *Agromyza phaseolunulata* Frost, 1943; *Liriomyza alliovora* Frick, 1955

Noms communs: mineuse du gerbera, mouche mineuse américaine

3. Détection

Les piqûres de nutrition et les galeries dans les feuilles sont généralement les premiers signes, et les plus apparents, de la présence de *Liriomyza*. Les agents de quarantaine devraient repérer aisément les galeries entièrement formées, en revanche, les premiers signes d'une infestation sont beaucoup moins évidents et peuvent facilement passer inaperçus (Spencer, 1989). Les galeries demeurent intactes et relativement inchangées pendant plusieurs semaines. La configuration des galeries est souvent considérée comme une indication fiable s'agissant d'identifier les différentes espèces d'agromyzides (car dans la plupart de ces cas, les espèces sont spécifiques de l'hôte). Mais, avec les espèces d'organismes nuisibles polyphages, la configuration des galeries dépend de l'hôte, de l'état physique et physiologique de chaque feuille et du

nombre de larves minant la même feuille. Compte tenu de cette forte variabilité, l'identification fondée uniquement sur la configuration des galeries devrait être employée avec prudence (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (OEPP), 2005). On trouvera dans les figures 2 à 4 des exemples de configuration de galeries relatifs aux quatre espèces d'organismes de quarantaine et à *L. strigata*.

Les mouches femelles utilisent leur ovipositeur pour perforer les feuilles des végétaux hôtes, provoquant des lésions qui servent de sites de nutrition (à la fois aux mouches femelles et aux mouches mâles) ou de ponte. Les piqûres de nutrition des espèces de *Liriomyza* ont une forme arrondie, généralement de 0,2 mm de diamètre environ, et apparaissent comme des taches blanches sur la surface supérieure de la feuille. Les piqûres de ponte sont habituellement plus petites (0,05 mm) et plus uniformément circulaires. Les piqûres de nutrition des espèces d'organismes nuisibles agromyzides polyphages *Chromatomyia horticola* et *Chromatomyia syngenesiae* sont nettement plus grandes et plus ovales que les piqûres des mouches *Liriomyza*. L'apparence des piqûres de nutrition et de ponte est la même pour toutes les espèces de *Liriomyza*, et le mode de répartition des piqûres sur une feuille ne peut pas être utilisé pour déterminer les espèces. Les piqûres de nutrition provoquent la destruction d'un grand nombre de cellules et sont bien visibles à l'œil nu (OEPP, 2005).

Les larves se nourrissent essentiellement dans la partie supérieure de la feuille, creusant des galeries dans le tissu palissadique vert. Les galeries sont généralement blanchâtres, avec des traînées d'excréments apparaissant comme des lignes brisées noires sur la longueur de la feuille. Des enroulements répétés dans la même petite zone de la feuille entraîneront souvent une coloration anormale de la galerie, avec l'apparition de zones humides noires et de zones sèches marron, résultant en général de la réaction du végétal à la présence de la mineuse des feuilles (OEPP, 2005).

Il existe trois stades larvaires, qui se nourrissent tous à l'intérieur des feuilles. En général, les larves se nourrissent du végétal dans lequel les œufs ont été pondus. Les larves de *Liriomyza* spp. quittent la feuille quand elles sont prêtes à se métamorphoser (Parrella et Bethke, 1984), et leur trou de sortie a une forme caractéristique d'incision semi-circulaire; en revanche, les larves de *C. horticola* et *C. syngenesiae* se métamorphosent à l'intérieur de la feuille à l'extrémité de la galerie larvaire, les stigmates antérieurs faisant généralement saillie sur la surface inférieure de la feuille. C'est pourquoi, on peut trouver les pupariums de *Liriomyza* dans les résidus de cultures, dans le sol ou, parfois, sur la surface des feuilles.

Selon les stades de développement présents, les espèces peuvent être observées en différents endroits du végétal et de ses alentours, comme suit:

- œufs: insérés juste sous la surface de la feuille
- larves: à l'intérieur de galeries creusées dans les feuilles
- pupes: dans les résidus de cultures, dans le sol ou parfois sur la surface des feuilles
- adultes: volant librement, ou posés sur la surface des feuilles pour produire des piqûres de nutrition ou de ponte.

3.1 Prélèvement et conservation de spécimens

Les mouches *Liriomyza* peuvent être prélevées, soit à des stades de développement immatures en même temps que des échantillons de feuilles minées, soit au stade adulte. Étant donné que les caractères morphologiques utiles à la diagnose des espèces concernent les génitalia des mâles, il faut disposer de mâles adultes pour confirmer l'identification de l'espèce. Souvent, les femelles adultes ne permettent une détermination fiable que jusqu'au niveau du genre. En prélevant de multiples spécimens sur un végétal ou en un lieu donné, on accroît les chances de trouver des mouches mâles, ce qui est important à moins que

l'on ne prévoit de recourir aux analyses moléculaires pour procéder à la diagnose sur des stades de développement immatures.

3.1.1 Prélèvement d'adultes

Les mouches adultes se trouvent habituellement sur le feuillage et peuvent être prélevées à la main ou être poussées du feuillage jusque dans des flacons en verre à l'aide d'un filet à papillons, ou encore être prélevées avec un échantillonneur à aspiration. Elles peuvent aussi être capturées au moyen de pièges adhésifs jaunes, en particulier dans les serres. Cependant, la méthode la plus commode et la plus fiable de prélèvement de mouches mineuses des feuilles, notamment les espèces de *Liriomyza*, consiste à cueillir des feuilles minées contenant des larves vivantes. Celles-ci peuvent être transférées dans un grand bocal pour produire des mouches adultes en laboratoire. On trouvera la description de techniques d'élevage d'agromyzides dans Griffiths (1962) et Fisher *et al.* (2005).

Les adultes et les larves peuvent être placés dans de l'éthanol à 70 % et y être conservés indéfiniment, bien que leur couleur pâlisse progressivement avec le temps. Les flacons contenant des spécimens dans de l'éthanol devraient être fermés hermétiquement pour éviter les fuites et être emballés avec du matériau de capitonnage dans une boîte rigide. La conservation à sec d'adultes, par exemple sous la forme de spécimens épinglés, est également possible.

Les spécimens destinés à faire l'objet d'une diagnose moléculaire devraient être tués et conservés dans de l'éthanol à 96 à 100 %, être stockés congelés (à environ -20 ou $-4,0$ °C) ou être déposés sur des cartes FTA (de Whatman)¹ (Blacket *et al.*, 2015).

3.1.2 Prélèvement de stades de développement immatures

Si l'on entend prélever et conserver des échantillons de végétaux, on devrait cueillir des feuilles présentant des piqûres de nutrition ou des galeries suspectes et les placer entre deux feuilles de papier journal pour les faire sécher lentement.

Les feuilles présentant des galeries occupées, à partir desquelles on prévoit d'élever des spécimens en laboratoire pour obtenir certains stades de développement, notamment des adultes, à des fins d'identification, doivent être emballées dans du papier absorbant, légèrement et non excessivement humide, et être expédiées dans des sachets capitonnés et hermétiquement fermés. En laboratoire, les feuilles dont les galeries sont occupées par des larves vivantes peuvent être placées dans des boîtes de Pétri fermées hermétiquement contenant des morceaux de papier filtre humide et être conservées dans un incubateur à environ 23 °C (des contrôles étant effectués tous les deux ou trois jours pour éliminer les feuilles qui présentent un développement de champignons, de bactéries, etc.).

4. Identification

L'identification des espèces de mineuses des feuilles par examen morphologique ne concerne que les spécimens adultes mâles parce qu'il n'existe pas de clé d'identification satisfaisante jusqu'au niveau de l'espèce, qui soit applicable aux adultes femelles ou aux œufs, aux larves ou aux pupes. L'identification de matériel adulte est possible au moyen de l'examen des caractères morphologiques, notamment des génitalia de la mouche mâle. Les caractères morphologiques des génitalia mâles sont examinés sous un microscope puissant (grossissement d'environ 100×). En appliquant ce protocole à des préparations de qualité, on devrait pouvoir identifier avec certitude les adultes des quatre espèces d'organismes de quarantaine de *Liriomyza* rien qu'au moyen d'un examen morphologique (à l'exception de *L. huidobrensis* et *L. langei* pour les raisons exposées dans la partie 1).

Les analyses moléculaires réalisées à des fins d'identification peuvent s'appliquer à tous les stades de développement, y compris les stades immatures à partir desquels il n'est pas possible de procéder à une identification morphologique jusqu'au niveau de l'espèce. De plus, dans les cas où les spécimens adultes sont atypiques ou endommagés, les analyses moléculaires peuvent fournir des informations complémentaires pertinentes sur l'identité. Cependant, les analyses moléculaires ont parfois une spécificité limitée, car elles auront été mises au point à des fins précises et évaluées pour un petit nombre d'espèces, sur des échantillons provenant de différentes régions géographiques. C'est pourquoi les résultats des analyses moléculaires doivent être interprétés avec prudence.

4.1 Identification morphologique d'un adulte de *Liriomyza*

Il faut procéder à l'examen des génitalia mâles (en particulier, le distiphallus (Figure 5)), pour parvenir à une identification positive de l'une quelconque des quatre espèces de *Liriomyza* visées. Une bonne méthode de préparation des spécimens (fondée sur Malipatil et Ridland, 2008) est brièvement décrite ci-après. On trouvera des informations supplémentaires sur cette méthode ou sur ses variantes dans Spencer (1981, 1992), Spencer et Steyskal (1986) et OEPP (2005). On devrait comparer les éléments relatifs à la structure distiphallique avec les caractères morphologiques externes (Tableau 1) pour confirmer l'identification de l'espèce.

4.1.1 Préparation des génitalia d'un adulte mâle de *Liriomyza* pour examen au microscope

4.1.1.1 Détermination du sexe des mouches

Chez la mouche mâle, les lobes de l'épandrium, qui sont sombres et pubescents et moins sclérifiés que le tube de la femelle, s'incurvent de part et d'autre et vers le bas à l'arrière de l'abdomen, du côté dorsal vers le côté ventral (Figure 6 a)). Entre les lobes, une ouverture en forme de fente, qui devient triangulaire quand elle est béante, permet d'observer le reste des génitalia mâles. Les lobes s'étendent à peine au-delà du dernier tergite. Chez la mouche femelle, les segments abdominaux après le sixième segment forment un tube noir fortement sclérifié, qui s'étend au-delà du sixième tergite (Figure 6 b)) et s'achève par une ouverture circulaire que l'on peut observer en vue postérieure de l'extrémité du tube. Le sixième tergite couvre la moitié basale du tube par-dessus, mais celle-ci reste visible en vues latérale et ventrale.

4.1.1.2 Préparation du distiphallus du mâle pour examen

On devrait détacher l'abdomen du corps pour faciliter l'élimination des tissus et l'observation. À cet effet, on peut employer des aiguilles à dissection fines (que l'on peut fabriquer en collant le côté non pointu de microépingles sur l'extrémité d'une allumette en bois, après y avoir préalablement pratiqué un trou peu profond avec une épingle normale) pour séparer l'abdomen du reste de la mouche avec précaution. L'abdomen peut être mis à bouillir dans de l'hydroxyde de potassium (KOH) à 10 % ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH) pendant 2 à 4 minutes ou bien être laissé à froid dans du KOH à 10 % ou du NaOH pendant toute la nuit pour éliminer les tissus. On transférera l'abdomen traité dans un bain d'eau distillée afin de neutraliser le KOH ou le NaOH. L'abdomen sera alors prêt à être placé dans une goutte de glycérol sur une lame porte-objets à cavité.

Sous une loupe binoculaire, le complexe génital est soigneusement dégagé des membranes qui l'enserrent, de la cuticule et des muscles concernés, à l'aide d'aiguilles à dissection fines. Le complexe génital est positionné, toujours à l'aide d'aiguilles à dissection fines, de manière à permettre une observation latérale au microscope composé, à un grossissement de 400×. Le complexe génital est ensuite repositionné pour permettre une observation ventrale du distiphallus à un grossissement de 400×, sans

être recouvert d'une lamelle. Le distiphallus doit être observé sous différents angles (par exemple latéral, dorsal, ventral), ce qui suppose que l'on puisse le repositionner sous grossissement plus faible.

Pour monter des lames semi-permanentes (destinées par exemple à une identification de routine), il faudrait transférer le complexe génital dans une goutte de glycérol sur une lame plate propre. Les génitalia sont délicatement immergées dans le milieu de montage et une lamelle ronde est soigneusement déposée par-dessus pour répartir régulièrement le glycérol.

S'il faut monter des lames permanentes, il faudrait nettoyer l'abdomen dans du KOH et le neutraliser à froid dans de l'acide acétique glacial comme indiqué ci-dessus. Ensuite, l'abdomen peut être transféré dans de l'éthanol à 70% et, sous une loupe binoculaire, le complexe génital peut être soigneusement dégagé des membranes qui l'enserrent, de la cuticule et des muscles concernés, à l'aide d'aiguilles à dissection fines. Les génitalia détachées devraient être transférées en premier lieu dans de l'éthanol absolu pendant 2 à 4 minutes, puis dans de l'huile essentielle de clou de girofle (où elles peuvent être conservées aussi longtemps que nécessaire). Les génitalia sont transférées dans de l'éthanol à 70% (pendant approximativement 10 minutes), puis dans de l'éthanol à 95% (pendant approximativement 10 minutes) et enfin dans de l'huile de girofle (pendant au moins 5 minutes). Les génitalia peuvent ensuite faire l'objet d'un montage permanent en étant placées sur une lame dans une goutte de baume du Canada avant d'être recouvertes d'une lamelle. Toutes les lames montées doivent être étiquetées avec mention des informations nécessaires sur le lieu, l'hôte, la date du prélèvement, le nom de la personne ayant procédé au prélèvement (s'il est connu), le nom de l'espèce, le nom de la personne ayant procédé à l'identification, et un code permettant de faire le lien avec le reste du spécimen.

Le reste du spécimen de mouche devrait être monté sur la pointe d'un triangle en carton et être accompagné d'une étiquette indiquant le code de référence aux génitalia montées sur la lame.

4.1.2 Identification de la famille des Agromyzidae

La famille des Agromyzidae compte environ 2 500 espèces dans le monde (Spencer, 1989, 1990). On trouvera des descriptions détaillées de la morphologie des agromyzides dans Spencer (1972, 1973, 1987), Dempewolf (2004) et Boucher (2010).

Dans le présent document, la nomenclature morphologique est reprise de Yeates *et al.* (2004). Cette ressource en ligne permet également de consulter des illustrations détaillées de l'anatomie d'une mouche acalyprate typique (telle qu'une mouche de la famille des Agromyzidae).

La combinaison de caractères ci-après définit la famille des Agromyzidae (Hennig, 1958; Spencer, 1987; Boucher 2010) (Figure 7):

- petite taille, allant de 1 à 6 mm, mais généralement de 1 à 3 mm
- vibrisses présentes
- une à sept soies frontales présentes
- aile avec interruption de la nervure costale présente à l'extrémité de la nervure sous-costale (Sc)
- Cellule alaire cup petite; nervures alaires A_1+CuA_2 n'atteignant pas le bord de l'aile
- mâle présentant des sclérites pré-génitaux avec complexe tergal correspondant à la fusion des tergites 6 à 8, et seulement deux stigmates entre le tergite 5 et le segment génital
- Femelle avec la partie antérieure du septième segment abdominal formant un oviscapte.

En général, les larves (Figure 8 a)) ont une forme cylindrique, plus effilée à l'avant, avec des projections portant les stigmates antérieur et postérieur (Figure 8 b) et d)), le premier situé sur la face dorsale du

prothorax, le deuxième orienté postérieurement à l'arrière. Les larves possèdent également des pièces buccales fortement sclérifiées; les mandibules et leur axe longitudinal forment quasiment un angle droit avec le reste du squelette céphalopharyngé (Figure 8 c)) et portent habituellement au moins deux paires de dents de même taille orientées vers l'avant, et les cornes ventrales (les paires de «bras» orientés vers l'arrière) sont généralement plus courtes que les dorsales.

Dans la pratique, on reconnaît les agromyzides au fait que leurs larves se nourrissent dans les tissus vivants des végétaux (les trois quarts d'entre elles sont mineuses des feuilles). Cependant, il existe des mineuses des feuilles chez d'autres familles de diptères, notamment les Anthomyiidae et les Drosophilidae. On trouvera dans Ferrar (1987), une synthèse d'informations sur la morphologie et la biologie des stades immatures des agromyzides, accompagnée d'une bibliographie détaillée et d'illustrations du squelette céphalopharyngé et des stigmates postérieurs d'un certain nombre d'espèces.

4.1.3 Identification du genre *Liriomyza*

Les mouches adultes du genre *Liriomyza* présentent les caractères morphologiques suivants (OEPP, 2005; Spencer, 1976):

- sétules fronto-orbitales réclinées (inclinées vers l'arrière)
- zone préscutellaire sombre de la même couleur que le scutum chez la plupart des espèces, rarement jaune
- scutellum jaune chez la plupart des espèces, rarement sombre
- la nervure sous-costale devient un pli à son extrémité distale et s'achève dans la nervure costale séparément
- la nervure costale s'étend jusqu'à la nervure M_{1+2}
- cellule discale (dm) petite
- deuxième nervure transverse (extérieure) (dm-cu) présente chez la plupart des espèces
- organe stridulatoire présent chez les mâles (un «grattoir», une crête chitineuse sur le fémur des pattes arrières; et une lime, une ligne de petites écailles chitineuses sur la membrane reliant les tergites et les sternites abdominaux).

Dans la pratique, vues de dessus, la plupart des espèces de *Liriomyza* (notamment les quatre espèces visées dans le présent protocole de diagnostic) sont essentiellement noires avec un front jaune et un scutellum jaune vif. Les pattes sont jaunes à divers degrés. Chez les espèces visées, la nervation des ailes (Figure 9) et les génitalia mâles sont typiques du genre.

Plusieurs genres peuvent être confondus avec *Liriomyza*. Les genres étroitement apparentés *Phytomyza*, *Chromatomyia* et *Phytoliriomyza* peuvent généralement être distingués de *Liriomyza* par leurs sétules fronto-orbitales proclinées (inclinées vers l'avant) (alors qu'elles sont toujours réclinées ou, occasionnellement, droites ou absentes chez *Liriomyza*), et par le scutellum, qui est généralement gris ou noir mais, occasionnellement, légèrement jaunâtre en son centre (alors qu'il est entièrement jaune chez la plupart des *Liriomyza*). Chez *Phytomyza* et *Chromatomyia*, la nervure costale s'étend seulement jusqu'à la nervure R_{4+5} , alors que chez *Phytoliriomyza* et *Liriomyza*, elle s'étend jusqu'à la nervure M_{1+2} (Spencer, 1977). Les espèces de *Phytoliriomyza* se nourrissent des tissus internes des végétaux et provoquent la formation de galles (sur les tiges ou les feuilles), tandis que les espèces de *Chromatomyia*, *Phytomyza* et *Liriomyza* sont généralement des mineuses des feuilles.

4.1.4 Identification des espèces de *Liriomyza*

4.1.4.1 Caractères morphologiques des adultes de *Liriomyza* spp.

Le Tableau 1 présente un résumé simplifié des principaux caractères utiles à la diagnose de *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* et *L. trifolii* (ainsi que de *L. strigata* aux fins de son élimination). Ce résumé est complété par des illustrations (photomicrographies) du distiphallus dans les figures 10 et 11.

On trouvera des descriptions et des illustrations plus précises de la morphologie de ces espèces dans Spencer (1965, 1973), Dempewolf (2004), Malipatil *et al.* (2004) et Shiao (2004). Les principaux caractères utiles à la diagnose sont montrés dans la base de données en ligne Pest and Disease Image Library (PaDIL) (Malipatil 2007a, 2007b, 2007c).

L'identification des adultes peut aussi être effectuée au moyen de clés de détermination. Malipatil et Ridland (2008) proposent une clé de détermination applicable à 17 espèces d'importance économique, notamment quelques espèces endémiques d'Australie. De plus, un système d'identification d'espèces d'organismes nuisibles du monde entier, fondé sur des photomicrographies, est disponible dans Dempewolf (2004). S'agissant plus particulièrement des clés de détermination des espèces de *Liriomyza*, on trouvera dans les documents appuyant les travaux de Spencer quelques catalogues et clés de détermination régionaux détaillés. Ils portent sur la faune locale propre à la région, qui diffère bien évidemment d'une région à l'autre, et ainsi influe de manière différenciée sur le processus d'élimination positive des taxons non visés. On trouvera une liste exhaustive de ces travaux dans Spencer (1973). En outre, la prise en considération du végétal hôte sur lequel l'espèce de *Liriomyza* suspectée d'être un organisme de quarantaine a été détectée peut permettre de réduire le nombre d'autres espèces d'agromyzides potentielles qui sont susceptibles d'être présentes dans le même contexte biologique et qu'il convient peut être d'écarter (par exemple, dans le cas de l'Europe, voir Ellis (non daté)).

Tableau 1. Caractères morphologiques des adultes de certaines espèces de *Liriomyza*[†]

| | <i>L. bryoniae</i> | <i>L. huidobrensis</i> [†] | <i>L. sativae</i> | <i>L. strigata</i> | <i>L. trifolii</i> |
|---------------------------------------|---|---|---|---|--|
| Distiphallus mâle | Deux bulbes distaux; pourtours des bulbes circulaires | Deux bulbes distaux, réunis seulement à leurs pourtours; pourtours des bulbes étirés antéroventralement | Un seul bulbe distal présentant une légère constriction entre les moitiés supérieure et inférieure en vue dorsoventrale; le bulbe apparaît plus sclérifié avec une tige basale plus courte | Deux bulbes distaux, réunis de leurs pourtours à leurs bases; pourtours des bulbes étirés antéroventralement | Un seul bulbe distal présentant une constriction marquée entre les moitiés supérieure et inférieure en vue dorsoventrale; le bulbe apparaît moins distinctement sclérifié avec une tige basale plus longue |
| Soies verticales | Les deux soies verticales sont sur un fond jaune | Les deux soies verticales sont sur un fond noir | Les soies verticales externes sont sur un fond noir susceptible d'aller jusqu'aux soies verticales internes, qui sont sur un fond jaune | Coloration noire derrière les yeux s'étendant au moins jusqu'aux soies verticales externes, mais les soies verticales internes sont sur un fond jaune | Les deux soies verticales sont sur un fond jaune |
| Anépisternum | Essentiellement jaune, petite marque noire sur la partie antérieure du bord inférieur | Jaune avec tache noire variable généralement sur les trois-quarts inférieurs | Essentiellement jaune, avec une zone sombre de taille variable, allant d'une petite barre le long du bord inférieur jusqu'à une tache tout le long du bord inférieur, très haute dans la partie antérieure et plus étroite dans la partie postérieure | Jaune, mais avec une tache noire variable sur les bords inférieur et antérieur, qui peut s'étendre sur toute la moitié inférieure | Jaune, petite marque gris noirâtre sur la partie antérieure du bord inférieur |
| Nervure Cu 1A | a (dernière partie de la nervure) deux fois plus longue que b (avant-dernière partie de la nervure) | a 2 à 2,5 fois plus longue que b | a 3 à 4 fois plus longue que b | a 2 à 3 fois plus longue que b | a 3 à 4 fois plus longue que b |
| Troisième segment de l'antenne | Petit, jaune | Légèrement élargi, généralement plus sombre | Petit, jaune | Petit, jaune | Petit, jaune |

| | <i>L. bryoniae</i> | <i>L. huidobrensis</i> [†] | <i>L. sativae</i> | <i>L. strigata</i> | <i>L. trifolii</i> |
|------------------------------------|--|--|--|--------------------------------------|--|
| Front et orbites | Front jaune vif, orbites légèrement plus pâles | Front jaune, généralement plus orange que jaune citron pâle; partie supérieure des orbites légèrement plus sombre au moins jusqu'aux soies orbitales supérieures | Front et orbites jaune vif | Front et orbites jaunes | Front et orbites jaunes |
| Fémur | Jaune vif avec quelques stries brunâtres | Jaune, plus sombre de manière variable avec des stries noires | Jaune vif | Jaune avec quelques stries brunâtres | Jaune, occasionnellement avec de légères stries brunâtres |
| Mésnotum | Noir, essentiellement brillant mais avec une nuance mate distincte | Noir, mat | Noir, brillant | Noir, brillant mais légèrement mat | Noir mat avec une nuance grise |
| Tergites abdominaux du mâle | Deuxième et troisième tergites visibles divisés par un sillon médian jaune | Seul le deuxième tergite visible est divisé par un sillon médian jaune | Seul le deuxième tergite visible est divisé par un sillon médian jaune | – | Du deuxième au cinquième les tergites visibles sont divisés par un sillon médian jaune |
| Longueur de l'aile | 1,75-2,1 mm | 1,7-2,25 mm | 1,3-1,7 mm | 1,8-2,1 mm | 1,3-1,7 mm |

Source: Compilation de données de Spencer (1973, 1976), et informations relatives au distiphallus tirées de OEPP (2005) et informations relatives aux tergites abdominaux mâles tirées de Shiao (2004) (l'analyse n'a pas porté sur *L. strigata*).

[†] Voir aussi les figures 7 à 11.

[‡] *L. langei* est morphologiquement indiscernable de *L. huidobrensis*.

4.1.4.2 Structure distiphallique des adultes mâles de *Liriomyza* spp.

Les espèces de *Liriomyza* examinées ici se divisent en deux groupes naturels distincts, en fonction de la structure des génitalia mâles (en particulier, le distiphallus), de la couleur du corps, et de la structure des stigmates postérieurs des larves:

- groupe 1: *L. bryoniae*, *L. huidobrensis* et *L. strigata*
- groupe 2: *L. sativae* et *L. trifolii*.

Cependant, les caractères externes des mouches adultes servant à l'identification (Tableau 1), en particulier les caractères fondés sur les couleurs, ne correspondent pas exactement à ces deux groupes.

Le distiphallus est une structure fragile très petite enserrée dans des membranes. C'est la partie terminale de l'édéage (organe d'intromission faisant partie des génitalia mâles) (Figure 5), et sa structure tridimensionnelle complexe est particulièrement utile à la diagnose. En effet, le distiphallus présente un caractère unique qui permet d'identifier fiablement les quatre espèces visées. La structure de base du distiphallus diffère entre les deux groupes d'espèces naturels: dans le groupe 1, il y a deux bulbes distaux côte à côte (Figure 10), tandis que dans le groupe 2, il n'y a qu'un seul bulbe distal, qui présente une constriction médiane le divisant en une partie inférieure et une partie supérieure distinctes (Figure 11). On trouvera ci-après une clé facilitant l'identification des quatre espèces visées à partir des caractéristiques du distiphallus. À toutes fins utiles, la clé porte également sur *L. strigata*, car cette espèce est étroitement apparentée à *L. bryoniae* et *L. huidobrensis* et est également polyphage, donc susceptible d'être trouvée sur les mêmes végétaux hôtes.

Les différences entre deux espèces sont parfois subtiles et il convient de recouper les éléments relatifs à la structure distiphallique avec les éléments liés à la morphologie externe (Tableau 1) afin de s'assurer que la structure distiphallique n'a pas été mal interprétée. Si toutes les observations concordent, on peut écarter toutes les autres espèces de *Liriomyza*, y compris celles qui ne sont pas examinées dans le présent protocole de diagnostic.

Clé de diagnose pour identifier *Liriomyza* spp. à partir des caractéristiques du distiphallus

Cette clé doit être utilisée avec les figures 10 et 11.

1. Un seul bulbe distal (Figure 11 e), f)).....2
 - Paire de bulbes distaux (Figure 10 a)–c), g)–k)).....3
2. Constriction marquée entre la partie apicale et la partie basale du bulbe: section basale fortement arrondie (Figure 11 f)).....*L. trifolii*
 - Légère constriction seulement entre la partie apicale et la partie basale du bulbe: section basale non fortement arrondie (Figure 11 e)).....*L. sativae*
3. Pourtours des bulbes circulaires (non étirés antéroventralement); uniformément sclérifiés (Figure 10 a))*L. bryoniae*
 - Pourtours des bulbes spiralés (étirés antéroventralement) (Figure 10 b), c))4
4. Bulbes réunis sur la ligne médiane, seulement à leurs pourtours (Figure 10 h)).....*L. huidobrensis**
 - Bulbes réunis sur la ligne médiane, de leurs pourtours à leurs bases (Figure 10 i)) *L. strigata*

* *L. langei* est morphologiquement indiscernable de *L. huidobrensis*.

4.1.4.3 Caractéristiques morphologiques des stades immatures des quatre espèces de *Liriomyza* visées

Sur les quatre stades de développement (œuf, larve, pupes et adulte), seule la mouche adulte mâle peut faire l'objet d'une identification positive au niveau de l'espèce, à partir des caractéristiques morphologiques (forme des génitalia du mâle). Les caractéristiques morphologiques des larves et des pupes permettent de distinguer les membres des deux groupes d'espèces naturels décrits à la partie 4.1.4.2. Ces données ne permettent pas, à elles seules, d'identifier l'espèce, mais elles peuvent y contribuer. Pour compléter l'identification morphologique, on peut procéder à des analyses moléculaires afin de distinguer les différentes espèces visées par le protocole (partie 4.2).

Œufs

Les œufs sont pondus dans le tissu des feuilles. Ils sont blancs et ovales et mesurent environ 0,25 mm de long. Aucune identification n'est possible, ni du genre ni de l'espèce.

Larves et pupes

Il existe trois stades larvaires, qui se nourrissent en creusant des galeries dans les tissus des feuilles. Les larves fraîchement écloses mesurent environ 0,5 mm de long, pour atteindre 3,0 mm en fin de croissance. Leur forme générale est typique des agromyzides (voir la partie 4.1.2). Les pupes (Figure 12) sont en forme de cylindres ovales, d'environ 2,0 mm de long, très légèrement aplatis ventralement, avec des stigmates antérieurs et postérieurs saillants. Dans la pratique, s'agissant des larves et des pupes, on peut distinguer les deux groupes naturels (mais pas les espèces au sein des groupes) à partir des caractères morphologiques, comme suit.

Larves du groupe 1

Les larves de *L. bryoniae*, *L. huidobrensis* et *L. strigata* sont de couleur crème mais, au stade larvaire final, développent dorsalement une tache jaune–orange à leur extrémité antérieure, qui peut s'étendre de part et d'autre jusque sur la surface ventrale (Figure 13). Chaque stigmate postérieur consiste en une ellipse bordée de pores. Il peut s'avérer difficile d'observer le nombre de pores, qui selon Spencer (1973) sont les suivants: *L. bryoniae*, 7-12 pores; *L. huidobrensis*, environ 6-9 pores; et *L. strigata*, 10-12 pores. Les pupariums sont de couleur variée, de jaune–orange à marron foncé. Chez *L. bryoniae* et *L. strigata*, les pupariums sont essentiellement, mais pas exclusivement, du côté le plus clair du spectre de couleurs. La couleur des pupariums de *L. huidobrensis* tend le plus souvent vers l'anthracite. La forme des stigmates larvaires est conservée dans le puparium mais les pores sont moins clairement discernables.

Larves du groupe 2

Les larves de *L. sativae* et *L. trifolii* sont translucides quand elles éclosent et deviennent ensuite jaune–orange sur toute la surface du corps. Chaque stigmate postérieur a la forme d'un triple cône avec trois pores, chacun sur une saillie distincte, les deux saillies externes étant plus allongées. Les pupariums sont orange jaunâtre, parfois d'un brun doré plus sombre. La forme des stigmates larvaires est conservée dans le puparium mais les détails sont moins apparents.

4.2 Identification moléculaire des espèces de *Liriomyza*

Diverses analyses moléculaires reposant sur une réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été employées pour identifier les espèces de *Liriomyza*, notamment la PCR-polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR), la PCR en point final réalisée avec des amorces spécifiques pour l'espèce, la PCR en temps réel et la comparaison de séquences d'ADN. Parmi ces analyses, celles qui peuvent être utilisées pour distinguer les quatre espèces visées (c'est-à-dire,

L. bryoniae, *L. huidobrensis*, *L. sativae* et *L. trifolii*) ou pour distinguer *L. huidobrensis* et *L. langei* sont décrites ci-après.

Dans le présent protocole de diagnostic, les analyses (et notamment la mention des noms commerciaux) sont décrites telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. Aucune des méthodes signalées pour ces espèces n'a été formellement validée du point de vue de la sensibilité analytique et de la reproductibilité. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnostic ne signifie pas que ceux-ci soient approuvés à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être ajustées aux normes des différents laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

La spécificité de chaque méthode est décrite ci-après. La description indique l'espèce de *Liriomyza* avec laquelle la méthode considérée a été évaluée et précise aussi à quelles fins l'essai a été initialement conçu. Compte tenu des limitations que présentent les analyses moléculaires, un résultat d'essai moléculaire négatif n'exclut pas la possibilité d'une identification positive à l'issue d'analyses morphologiques.

4.2.1 Témoins des analyses moléculaires

Pour que les résultats des analyses soient considérés comme fiables, des témoins adaptés – qui dépendront du type d'analyse réalisée et du degré de certitude requis – devraient être intégrés dans chaque série d'isolements d'acide nucléique et d'amplifications d'acide nucléique de l'organisme nuisible visé. S'agissant de la PCR, un acide nucléique témoin positif, un témoin négatif d'amplification et, s'il y a lieu, un témoin négatif d'extraction sont, au minimum, les témoins qui devraient être employés.

4.2.2 Extraction de l'ADN

Aux fins des applications PCR, on peut extraire de l'ADN à partir d'un seul spécimen de larve, de puppe ou d'adulte de *Liriomyza*, au moyen de divers kits d'extraction d'ADN vendus dans le commerce et en suivant les instructions du fabricant (Scheffer *et al.*, 2001, 2006; Kox *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2013). On trouvera dans le document source des informations supplémentaires sur les kits utilisés dans chacun des essais décrits ci-dessous. Les laboratoires peuvent estimer que d'autres techniques d'extraction fonctionnent avec la même efficacité; on peut extraire l'ADN en suivant n'importe quelle méthode d'extraction d'ADN adaptée aux insectes. Dans tous les protocoles publiés, le tissu traité est écrasé ou pilé à l'aide d'un micropilon stérile ou d'un dispositif analogue.

Acide nucléique témoin positif. Ce témoin sert à contrôler si l'essai s'est déroulé comme prévu dans les conditions et avec les paramètres de l'expérimentation. Tout acide nucléique contenant la séquence visée (c'est-à-dire un acide nucléique de *Liriomyza* analysé antérieurement) est un témoin positif.

Témoin négatif d'amplification (témoin exempt de matrice, «no template control»). Ce témoin doit être utilisé dans toute PCR pour écarter les faux positifs dus à une contamination pendant la préparation du mélange de réaction ou à une amplification non spécifique. À l'étape de l'amplification, on ajoute de l'eau de qualité PCR qui a servi à préparer ce mélange à la place du volume d'ADN.

Témoin négatif d'extraction. Ce témoin est utilisé pour vérifier la survenue éventuelle d'une contamination pendant l'extraction de l'acide nucléique et/ou d'une réaction croisée avec le tissu de l'hôte. Le témoin comprend une réaction d'extraction sans échantillon de tissu ajouté.

4.2.3 Identification par PCR-PLFR des quatre espèces visées

Kox *et al.* (2005) décrivent une analyse PCR-PLFR d'une région du gène de la *sous-unité II de la cytochrome oxydase (COII)*, qui peut permettre de distinguer les quatre espèces visées. La spécificité

de l'analyse a fait l'objet de recherches supplémentaires, avec l'analyse de quatre autres espèces de *Liriomyza*: *L. strigata*, *L. langei*, *L. chinensis* et *L. scorzonerae*. Les spécimens de *L. langei* et *L. huidobrensis* n'ont pas pu être distingués au moyen de cette analyse. Les trois autres espèces ont pu être séparées.

4.2.3.1 Amplification du gène de la COII

D'après Kox *et al.* (2005), les échantillons sont amplifiés dans 50 µl de mélange de réaction composé comme suit (concentrations finales des réactifs): 0,6 µM de chaque amorce, 0,2 mM des désoxynucléotides triphosphates (dNTP), 1 U de HotStarTaq¹ ADN polymérase, tampon PCR 1× et 1,5 mM de MgCl₂. Chaque réaction est réalisée avec, soit 1–5 µl d'ADN comme matrice, soit de l'eau de qualité PCR comme témoin négatif. La PCR est effectuée avec le couple d'amorces suivant:

TL2-J-3037-sens (F): 5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3' (Simon *et al.*, 1994)

K-N-3785Lir-antisens (R): 5'-GTT(A/T)AAGAGACCATT(A/G)CTTG-3'
(Kox *et al.*, 2005)

Les paramètres de thermocyclage de la PCR sont les suivants: une étape de dénaturation de 15 minutes à 95 °C, suivie de 35 cycles de (15 secondes à 94 °C, 1 minute à 55 °C et 45 secondes à 72 °C), puis une élongation finale de 10 minutes à 72 °C avant un refroidissement à température ambiante. Après l'amplification PCR, on soumet 5 µl de produit de la PCR à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5%, dans un tampon d'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) (TAE), avec une échelle d'ADN de 100 paires de bases (pb) pour s'assurer de la présence de produits de la PCR avant de procéder à l'analyse PLFR.

La PCR *COII* est jugée valide seulement si:

- le témoin positif produit un amplicon de la taille attendue pour le gène de la *COII* ciblé
- le témoin négatif d'extraction et le témoin négatif d'amplification ne produisent pas d'amplicon de la taille attendue pour le gène de la *COII* ciblé.

4.2.3.2 Digestion par enzymes de restriction et séparation des produits

Pour chaque échantillon, 5 µl de produit de la PCR sont digérés par les enzymes de restriction *DdeI*, *HinfI*, *SspI* et *TaqI*, chacun faisant l'objet d'une réaction séparée, selon les instructions du fabricant. On soumet ensuite le produit de la PCR digéré à une séparation par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3 % dans du tampon TAE, avec une échelle d'ADN de 100 pb pour permettre la détermination de la taille des fragments.

Il n'est pas possible de déterminer la taille exacte des fragments des produits digérés, après séparation dans les conditions électrophorétiques décrites, mais les valeurs de séparation relatives permettent de comparer les profils obtenus aux profils PLFR attendus pour les espèces. On peut examiner des témoins positifs, dont les tailles et les profils des fragments sont connus, avec les échantillons analysés, afin de pouvoir comparer les tailles avec davantage de précision. Pour chaque enzyme de digestion, on devrait réaliser un essai avec un témoin positif afin de s'assurer que l'enzyme digère l'ADN comme prévu. L'analyse PLFR est jugée valide seulement si le témoin positif produit des fragments de la taille attendue pour le gène de la *COII* ciblé. Les profils PLFR observés sur le gel d'agarose permettent de différencier les quatre espèces de *Liriomyza* visées. On trouvera au Tableau 2

¹ Dans le présent protocole de diagnostic, les méthodes (et notamment la mention des noms commerciaux) sont indiquées telles que publiées, car ce sont elles qui définissent les niveaux de sensibilité, spécificité et/ou reproductibilité initialement obtenus. L'emploi de noms de réactifs, produits chimiques ou matériel dans le présent protocole de diagnostic ne signifie pas que ceux-ci sont approuvés à l'exclusion d'autres qui peuvent aussi convenir. Les procédures de laboratoire présentées dans les protocoles peuvent être adaptées aux normes des divers laboratoires, sous réserve qu'elles soient validées de façon adéquate.

les différents profils utiles à la diagnose des espèces, par enzyme. Si le profil composite de fragments d'un échantillon correspond au profil connu de l'une des cinq espèces présenté dans le tableau, l'échantillon peut être identifié comme appartenant à cette espèce sur la base de l'analyse. Si le profil de fragments ne correspond à aucun des profils de fragments connus, le résultat de la diagnose est que l'échantillon n'appartient pas à ces espèces sur la base de l'analyse. Si le résultat de la diagnose est que l'échantillon appartient à l'espèce *L. huidobrensis*, il peut être nécessaire de poursuivre l'analyse pour confirmer qu'il ne s'agit pas de l'espèce cryptique *L. langei* (partie 4.2.5).

Tableau 2. Profils de polymorphisme de longueur des fragments de restriction pour certaines espèces de *Liriomyza*

| Espèce | Tailles prévues des fragments (en paires de bases) pour chaque enzyme de restriction | | | |
|--|--|------------------|--------------|---|
| | <i>Ddel</i> | <i>HinfI</i> | <i>Sspl</i> | <i>TaqI</i> |
| <i>L. bryoniae</i> | 790 | 421, 369 | 392, 326, 72 | 486, 163, 111, 30 |
| <i>L. huidobrensis</i> [†] | 790 | 421, 369 | 399, 391 | 306, 163, 159, 111, 30, 21 |
| <i>L. sativae</i> «États-Unis» [‡] | 567, 223 | 421, 282, 59, 27 | 399, 391 | 306, 210, 163, 81, 30 |
| <i>L. sativae</i> «Asie» [‡] | 790 | 421, 310, 59 | 717, 73 | 306, 210, 163, 81, 30 |
| <i>L. strigata</i> | 790 | 421, 342, 27 | 399, 391 | 267, 219, 141, 72, 67 |
| <i>L. trifolii</i> | 619, 171 ou 386, 223, 171 | 421, 310, 59 | 391, 326, 73 | 306, 163, 159, 141, 21 ou 306, 163, 159, 111, 30, 21 |

Source: Données tirées de Kox *et al.* (2005).

[†] Y compris les espèces cryptiques *L. langei*.

[‡] États-Unis et Asie sont des variantes possibles connues; dans les deux cas, il s'agit de *L. sativae*.

4.2.4 Amorces PCR spécifiques pour les espèces, permettant l'identification des quatre espèces visées

Nakamura *et al* (2013) on décrit une analyse PCR multiplex permettant de distinguer les quatre espèces visées sans devoir recourir à une procédure post-PCR de digestion par enzyme de restriction. Cette analyse comporte l'utilisation de six amorces qui ciblent le gène de la *sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI)*. Cinq de ces amorces s'hybrident avec une séquence propre à une seule espèce de *Liriomyza*, et sont employées comme amorces sens. La sixième amorce s'hybride avec un segment du gène de la *COI* conservé dans toutes les espèces de *Liriomyza*, et est employée comme amorce antisens, afin de compléter l'appariement des amorces. La taille des amplicons peut permettre d'établir une distinction entre *L. bryoniae*, *L. huidobrensis*, *L. sativae*, *L. trifolii* et *L. chinensis*. À la différence de l'analyse PCR-PLFR de Kox *et al.* (2005) (partie 4.2.3), la spécificité de cette analyse au regard de *L. strigata* n'a pas été vérifiée.

4.2.4.1 Amplification du gène de la COI

D'après Nakamura *et al.* (2013), les échantillons sont amplifiés dans 10 µl de mélange de réaction composé comme suit (concentrations finales des réactifs): 0,5 µM de chacune des six amorces, 0,2 mM des dNTP, 1 U de TaKaRa¹ Ex Taq ADN polymérase, Tampon PCR TaKaRa¹ Ex Taq 1× et 2 mM de MgCl₂. Chaque réaction est réalisée avec, soit 0,5 µl d'ADN comme matrice, soit de l'eau de qualité PCR comme témoin négatif. La PCR est effectuée avec les six amorces conçues par Nakamura *et al.* (2013), ci-après :

Lb600-F: 5'-CTAGGAATGATTTATGCAATG-3'

Lc920-F: 5'-CATGACACTTATTATGTTGTTGCA-3'

Lh1150-F: 5'-CAATCGGATCTTCAATTTCCCTTC-3'

Ls1040-F: 5'-TTATTGGTGTA AATTTAACC-3'

Lt780-F: 5'-TTATACACCAACTACTTTGTGAA-3'

L1250-R: 5'-GAATWGGRWAAATYACTTGACGTTG-3'

Les paramètres de thermocyclage de la PCR sont les suivants: une étape de dénaturation de 1 minute à 94 °C, suivie de 32 cycles de (30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 55 °C et 2 minutes à 72 °C). On visualise les produits de la PCR au moyen d'une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,8 %, avec une échelle d'ADN de 100 pb pour pouvoir déterminer la taille des amplicons.

La COI PCR multiplex est jugée valide seulement si:

- le témoin positif produit un amplicon de la taille attendue pour le gène de la COI ciblé
- le témoin négatif d'extraction et le témoin négatif d'amplification ne produisent pas d'amplicon de la taille attendue pour le gène de la COI ciblé.

Les tailles attendues des produits de la PCR des cinq espèces sont les suivantes: 649 pb (*L. bryoniae*), 359 pb (*L. chinensis*), 107 pb (*L. huidobrensis/L. langei*), 207 pb (*L. sativae*) et 461 pb (*L. trifolii*). Il n'est pas possible de déterminer la taille exacte des fragments des produits de la PCR, après séparation dans les conditions électrophorétiques décrites, mais pour chaque espèce les valeurs de séparation relatives permettent de comparer les résultats aux profils attendus pour l'amorce spécifique de l'espèce. On peut faire examiner des témoins positifs, dont on connaît la taille des bandes pour l'espèce, avec les échantillons analysés, afin de pouvoir comparer les tailles avec davantage de précision.

Un échantillon est identifié comme appartenant à l'une des cinq espèces s'il produit un seul amplicon de la taille attendue pour cette espèce. Cette analyse ne permet pas de distinguer *L. huidobrensis* de *L. langei*. Si l'on a des raisons de croire qu'un échantillon appartient à l'espèce *L. huidobrensis*, il peut être nécessaire de poursuivre l'analyse pour confirmer qu'il ne s'agit pas de l'espèce cryptique *L. langei* (partie 4.2.5). Cette analyse a été mise au point en vue de l'identification de *Liriomyza* au Japon et sa spécificité a été adaptée à cette fin. En conséquence, la réactivité croisée avec *L. strigata* et les populations de *L. trifolii* présentes hors du Japon n'a pas été vérifiée.

4.2.5 Distinction entre les espèces cryptiques *L. langei* et *L. huidobrensis*

4.2.5.1 PCR-PLFR

Scheffer *et al.* (2001) ont décrit une analyse PCR-PLFR permettant de distinguer *L. huidobrensis* et *L. langei* au moyen de la variation d'un locus mitochondrial contenant une partie du gène de la *COI*, l'ARN de transfert (ARNt) de la leucine et la totalité du gène de la *COII*. Cette région de 1 031 pb est amplifiée avec les amorces décrites dans Simon *et al.* (1994):

C1-J-2797-F: 5'-CCTC-GACGTTATTCAGATTACC-3'

TK-N-3785-R: 5'- GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3'

Les paramètres de thermocyclage de la PCR sont les suivants: une étape de dénaturation de 2 minutes à 92 °C, suivie de 35 cycles de (1 minute 30 secondes à 92 °C, 1 minute 30 secondes à 50 °C et 2 minutes 30 secondes à 72 °C, puis une étape finale d'élongation de 7 minutes à 72 °C). Après l'amplification PCR, on soumet le produit de la PCR à une électrophorèse avec une échelle d'ADN pour vérifier la réussite de la PCR avant de procéder à l'analyse PLFR.

La *COI*–*COII* PCR est jugée valide seulement si:

- le témoin positif produit un amplicon de la taille attendue pour le gène de la *COII* ciblé
- le témoin négatif d'extraction et le témoin négatif d'amplification ne produisent pas d'amplicon de la taille attendue pour le gène de la *COII* ciblé.

Pour chaque échantillon, le produit de la PCR est digéré avec les enzymes de restriction *SpeI* et *EcoRV*, chacun faisant l'objet d'une réaction séparée, selon les instructions du fabricant. On soumet ensuite le produit de la PCR digéré à une séparation par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % avec une échelle d'ADN de 100 pb pour permettre la détermination de la taille des fragments.

Il n'est pas possible de déterminer la taille exacte des fragments des produits digérés, après séparation dans les conditions électrophorétiques décrites, mais les valeurs de séparation relatives permettent de comparer les profils obtenus aux profils PLFR attendus pour les différentes espèces. On peut examiner des témoins positifs, dont les tailles et les profils des fragments sont connus, avec les échantillons analysés, afin de pouvoir comparer les tailles avec davantage de précision. Pour chaque enzyme de digestion, on devrait réaliser un essai avec un témoin positif afin de s'assurer que l'enzyme digère l'ADN comme prévu. L'analyse PLFR est jugée valide seulement si le témoin positif produit des fragments de la taille attendue pour le gène ciblé.

Les échantillons de *L. huidobrensis* produisent un fragment unique non sectionné (1 031 pb) lorsqu'ils sont digérés avec *SpeI* et deux fragments sectionnés (175 pb et 856 pb) lorsqu'ils sont digérés avec *EcoRV*. En revanche, les échantillons de *L. langei* produisent deux fragments sectionnés (420 pb et 611 pb) lorsqu'ils sont digérés avec *SpeI* et un seul fragment non sectionné (1 031 pb) lorsqu'ils sont digérés avec *EcoRV*. Si le profil composite de fragments d'un échantillon correspond à ces profils de fragments connus, l'échantillon peut être identifié comme appartenant à l'espèce correspondante sur la base de l'analyse.

4.2.5.2 Comparaison de séquences d'ADN

Scheffer (2000) a décrit une PCR et un séquençage d'ADN relatifs à un locus d'ADN mitochondrial contenant des séquences partielles des gènes de la *COI* et de la *COII*, qui permettent de distinguer les deux espèces cryptiques *L. huidobrensis* et *L. langei*. Dans une publication ultérieure, Scheffer *et al.* (2006) ont ajouté des séquences supplémentaires de l'extrémité 3' du gène de la *COI*, pertinentes pour les recherches sur la diversité des espèces. Ces données ont été analysées au moyen de techniques de la phylogénie moléculaire mais n'ont pas donné lieu à l'élaboration de protocoles de diagnostic.

4.2.6 «Codes-barres» de l'ADN

On s'emploie actuellement à mettre en place une ressource plus exhaustive sur le plan taxonomique des séquences d'ADN répertoriées relatives à la région 5' du gène de la *COI* de *Liriomyza*, utilisée dans les études ayant trait aux codes-barres d'ADN animal (par exemple, Bhuiya *et al.*, 2011; Maharjan *et al.*, 2014). À l'heure actuelle, les codes-barres d'ADN de 31 espèces de *Liriomyza* (notamment les quatre espèces visées) sont répertoriés dans la base de données Barcode of Life Data System (BOLD) (<http://www.boldsystems.org>). On trouvera d'autres codes-barres et d'autres procédures sur la Q-bank (www.q-bank.eu), une base de données structurée contenant des séquences obtenues à partir de matériel de référence. Dans une étude récente (Maharjan *et al.*, 2014), des indications sont fournies pour la séparation de *L. huidobrensis*, *L. trifolii*, *L. sativae*, *L. bryoniae* et *L. chinensis*. Malgré ces avancées en matière de ressources de séquençage d'ADN, la méthodologie relative à l'identification des espèces de *Liriomyza* n'est pas décrite en détail dans le présent document parce que les règles d'interprétation applicables aux ressources n'ont pas encore été publiées dans la littérature scientifique. Les résultats d'une identification effectuée au moyen des codes-barres devraient être interprétés avec prudence car les problèmes suivants peuvent survenir: 1) amplification PCR préférentielle potentielle de parasitoïdes ou de copies mitochondriales nucléaires du gène de la *COI* (c'est-à-dire, pseudogènes mitochondriaux nucléaires (numt)); 2) possibilité d'identification erronée résultant d'une confusion avec des espèces sœurs étroitement apparentées (c'est-à-dire des espèces complexes); et 3) différentes aires de répartition géographique des spécimens de référence répertoriés dans les bases de données sur les séquences.

5. Données à conserver

Les données et les éléments à consigner et à conserver sont énumérés à la partie 2.5 de la NIMP 27 (*Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés*).

Lorsque les résultats de la diagnose peuvent porter préjudice à d'autres parties contractantes, les données et les éléments probants ci-après ainsi que du matériel supplémentaire devraient être conservés pendant au moins un an d'une manière qui garantisse la traçabilité: spécimens conservés ou montés sur une lame, photographies des structures taxonomiques distinctives, extraits d'ADN et photographies de gels.

6. Points de contact pour tout complément d'informations

Un complément d'informations sur le présent protocole peut être obtenu auprès des sources suivantes:

Département du développement économique, de l'emploi, du transport et des ressources du Gouvernement de l'État de Victoria, AgriBio, 5 Ring Road, Bundoora, Vic. 3083, Australie (Mallik Malipatil; courriel: mallik.malipatil@ecodev.vic.gov.au; téléphone: +61 3 9032 7302; télécopie: +61 3 9032 7604).

Fera Science Ltd (Fera), National Agri-Food Innovation Campus, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, Royaume-Uni (Dominique Collins; courriel: dom.collins@fera.co.uk; téléphone: +44 1904 462215; télécopie: +44 1904 462111).

Une demande de révision d'un protocole de diagnostic peut être présentée par les organisations nationales de la protection des végétaux (ONPV), les organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) ou les organes subsidiaires de la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) par l'intermédiaire du Secrétariat de la CIPV (ippc@fao.org), qui la communique au Groupe technique sur les protocoles de diagnostic.

7. Remerciements

La première version du présent protocole a été rédigée par Mallik B. Malipatil (Département du développement économique, de l'emploi, du transport et des ressources du Gouvernement de l'État de Victoria, Australie), Dominique W. Collins (Fera, Royaume-Uni) et Mark Blacket (Département du développement économique, de l'emploi, du transport et des ressources du Gouvernement de l'État de Victoria, Australie), la partie relative à l'identification moléculaire ayant été rédigée par Norman Barr (Ministère de l'agriculture des États-Unis – Service d'inspection phytosanitaire et vétérinaire, États-Unis).

Les personnes suivantes ont examiné la version préliminaire du présent document et formulé des observations: Stephen Gaimari (Département de l'alimentation et de l'agriculture de Californie, États-Unis), Anthony Rice (Ministère de l'agriculture et de l'eau, Australie), Ren Iwaizumi (Station de la protection des végétaux de Yokohama, Ministère de l'agriculture, des forêts et de la pêche, Japon) et Ramona Vaitkevica (Service public de la protection des végétaux de la Lettonie).

8. Références

Le présent protocole de diagnostic fait également référence aux Normes internationales pour les mesures phytosanitaires (NIMP). Les NIMP sont publiées sur le Portail international phytosanitaire, à la page: <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

- Bhuiya, B.A., Amin, S. et Mazumdar, S.** 2011. First report of vegetable leafminer *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) through DNA barcoding from Bangladesh. *Journal of Taxonomy and Biodiversity Research*, 5: 15–17.
- Blacket, M.J., Rice, A.D., Semeraro, L. et Malipatil, M.B.** 2015. DNA-based identifications reveal multiple introductions of the vegetable leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) into the Torres Strait Islands and Papua New Guinea. *Bulletin of Entomological Research*, doi: 10.1017/S0007485315000383.
- Blanchard, E.E.** 1926. A dipterous leaf-miner on *Cineraria*, new to science. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*, 1: 10–11.
- Boucher, S.** 2010. Family Agromyzidae (leaf-mining flies). In B.V. Brown, A. Borkent, J.M. Cumming, D.M. Wood, N.E. Woodley et M. Zumbado (sous la direction de). *Manual of Central American Diptera*, Vol. 2, pp. 1057–1071. Ottawa, National Research Council. 728 pp.
- CAB International.** 2013. Crop protection compendium. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International. En ligne à l'adresse <http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp> (dernier accès le 24 août 2014).
- Dempewolf, M.** 2001. Larvalmorphologie und Phylogenie der Agromyzidae (Diptera). Université de Bielefeld, Allemagne (thèse).
- Dempewolf, M.** 2004. Arthropods of economic importance: Agromyzidae. Amsterdam, Pays-Bas, Biodiversity Information Facility. En ligne à l'adresse <http://wbd.etibioinformatics.nl/bis/agromyzidae.php> (dernier accès le 24 août 2014).
- Ellis, W.N. s.d.** Leafminers and plant galls of Europe. En ligne à l'adresse <http://www.bladmineerders.nl/> (dernier accès le 24 août 2014) (en anglais et néerlandais).
- OEPP** (Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes). 2005. *Liriomyza* spp. PM 7/53(1). *Bulletin OEPP*, 35: 335–344.
- Ferrar, P.A.** 1987. A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera: Cyclorrhapha. *Entomograph*, 8: 1–907.
- Fisher, N., Ubaidillah, R., Reina, P. et La Salle, J.** 2005. *Liriomyza* parasitoids of Southeast Asia. Melbourne, Australie, Organisation de la recherche scientifique et industrielle du Commonwealth (CSIRO). En ligne à l'adresse http://www.ento.csiro.au/science/Liriomyza_ver3/index.html (dernier accès le 24 août 2014).

- Frick, K.E.** 1951. *Liriomyza langei*, a new species of leaf-miner of economic importance in California. *Pan-Pacific Entomologist*, 21: 81–88.
- Griffiths, G.C.D.** 1962. Breeding leaf-mining flies and their parasites. *Entomologist's Record and Journal of Variation*, 74: 178–185, 203–206.
- Hennig, W.** 1958. Die Familien der Diptera Schizophora und ihre phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen. *Beiträge zur Entomologie*, 8: 505–688.
- Kox, L.F.F., van den Beld, H.E., Lindhout, B.I. et de Goffau, L.J.W.** 2005. Identification of economically important *Liriomyza* species by PCR-RFLP analysis. *Bulletin OEPP*, 35: 79–85.
- Lonsdale, O.** 2011. The *Liriomyza* (Agromyzidae: Schizophora: Diptera) of California. *Zootaxa*, 2850: 1–123.
- Maharjan, R., Oh, H-W. et Jung, C.** 2014. Morphological and genetic characteristics of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae) infesting potato crops in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17: 281–286.
- Malipatil, M.B.** 2007a. Chickpea leafminer (*Liriomyza cicerina*). Pest and Disease Image Library (PaDIL). En ligne à l'adresse <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136238> (dernier accès le 24 août 2014).
- Malipatil, M.B.** 2007b. Pea leafminer (*Liriomyza huidobrensis*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. En ligne à l'adresse <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136237> (dernier accès le 24 août 2014).
- Malipatil, M.B.** 2007c. American serpentine leafminer (*Liriomyza trifolii*). Pest and Disease Image Library (PaDIL), images and fact sheets. En ligne à l'adresse <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/136236> (dernier accès le 24 août 2014).
- Malipatil, M. et Ridland, P.** 2008. *Polyphagous agromyzid leafminers: Identifying polyphagous agromyzid leafminers (Diptera: Agromyzidae) threatening Australian primary industries*. Canberra, Ministère de l'agriculture, des pêches et des forêts, Gouvernement australien. En ligne à l'adresse <http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/leafminers/> (dernier accès le 24 août 2014).
- Malipatil, M.B., Ridland, P.M., Rauf, A., Watung, J. et Kandowangko, D.** 2004. New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia. *Formosan Entomologist*, 24: 287–292.
- Martinez, M. et Etienne, J.** 2002. Liste systématique et biogéographique des Agromyzidae (Diptera) de la région néotropicale. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura (Serie II)*, 34: 25–52 (en français).
- Nakamura, S., Masuda, T., Mochizuki, A., Konishi, K., Tokumaru, S., Ueno, K. et Yamaguchi, T.** 2013. Primer design for identifying economically important *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) by multiplex PCR. *Molecular Ecology Resources*, 13: 96–102.
- Pape, T., Beuk, P. et Martinez, M., eds.** 2013. Fauna Europaea, version 2.6. En ligne à l'adresse <http://www.faunaeur.org> (dernier accès le 24 août 2014).
- Parrella, M.P. et Bethke, J.A.** 1984. Biological studies of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) on chrysanthemum, aster and pea. *Journal of Economic Entomology*, 77: 342–345.
- Pitkin, B., Ellis, W., Plant, C. et Edmunds, R.** s.d. *The leaf and stem mines of British flies and other insects*. En ligne à l'adresse <http://www.ukflymines.co.uk> (dernier accès le 24 août 2014).
- Scheffer, S.J.** 2000. Molecular evidence of cryptic species within the *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Journal of Economic Entomology*, 93: 1146–1151.
- Scheffer, S.J. et Lewis, M.L.** 2001. Two nuclear genes confirm mitochondrial evidence of cryptic species within *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94: 648–653.
- Scheffer, S.J., Lewis, M.L. et Joshi, R.C.** 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 204–210.

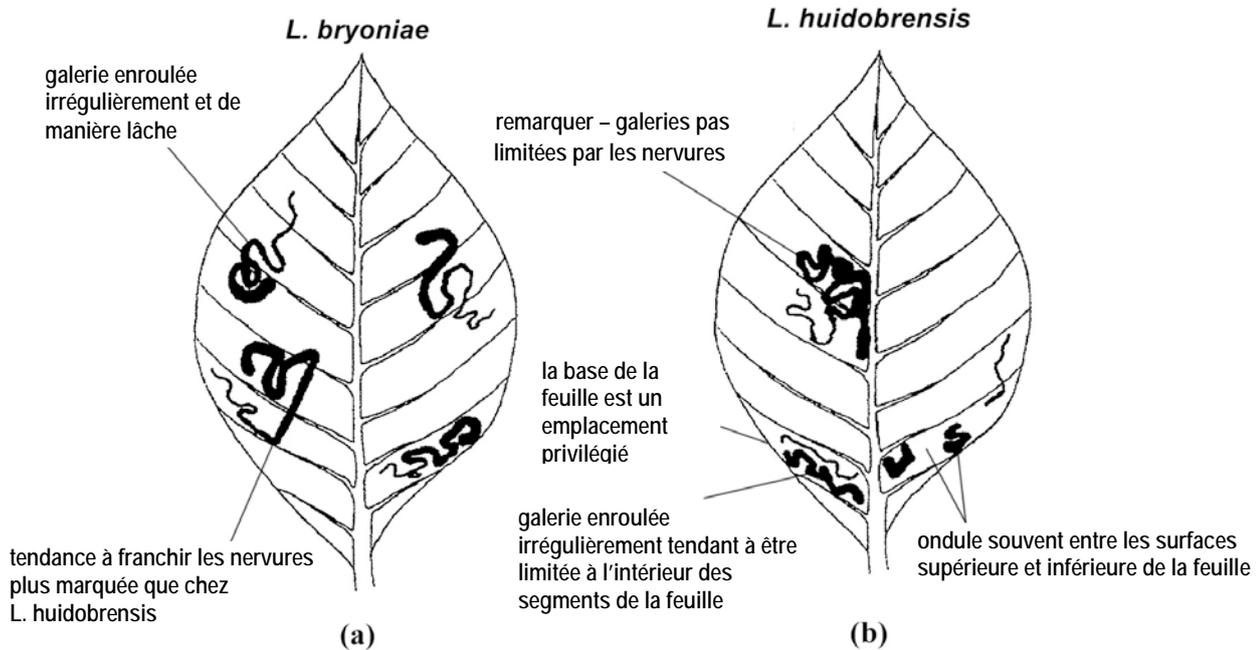
- Scheffer, S.J., Wijesekara, A., Visser, D. et Hallett, R.H.** 2001. Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. langei*. *Journal of Economic Entomology*, 94: 1177–1182.
- Shiao, S.F.** 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Applied Entomology and Zoology*, 39: 27–39.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi B., Liu, H. et Flook, P.** 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–701.
- Spencer, K.A.** 1965. A clarification of the status of *Liriomyza trifolii* (Burgess) and some related species (Diptera: Agromyzidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 67: 32–40.
- Spencer, K.A.** 1972. *Diptera, Agromyzidae*. Royal Entomological Society of London Handbooks for the Identification of British Insects, Vol. 10, Part 5(g). Londres, Royal Entomological Society of London. 136 pp.
- Spencer, K.A.** 1973. *Agromyzidae (Diptera) of economic importance*. Series Entomologica 9. La Haye, W. Junk. 418 pp.
- Spencer, K.A.** 1976. The Agromyzidae (Diptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 5: parts 1 and 2.
- Spencer, K.A.** 1977. *A revision of the Australian Agromyzidae (Diptera)*. Western Australian Museum Special Publication No. 8. 255 pp.
- Spencer, K.A.** 1981. *A revisionary study of the leaf-mining flies (Agromyzidae) of California*. University of California, Division of Agricultural Sciences Publication 3273. 489 pp.
- Spencer, K.A.** 1987. Agromyzidae. In J.F. McAlpine, ed. *Manual of Nearctic Diptera*, Vol. 2. Monograph no. 28, pp. 675–1332. Ottawa, Research Branch Agriculture Canada.
- Spencer, K.A.** 1989. Leaf miners. In R.P. Kahn, ed. *Plant protection and quarantine*, Vol. 2, Selected pests and pathogens of quarantine significance, pp. 77–98. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Spencer, K.A.** 1990. *Host specialization in the world Agromyzidae (Diptera)*. Series Entomologica 45. Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic Publishers. 444 pp.
- Spencer, K.A.** 1992. *Flycatcher: Memoirs of an amateur entomologist*. La Haye, Pays-Bas, SPB Academic Publishing. 414 pp.
- Spencer, K.A. et Steyskal, G.C.** 1986. *Manual of the Agromyzidae (Diptera) of the United States*. Agriculture Handbook 638. Washington, Ministère de l'agriculture des États-Unis d'Amérique. 478 pp.
- Stehr, F.W.** 1991. *Immature Insects*. Vol.2 Kendall/Hunt Publishing company, USA. 974 pp.
- Takano, S.I., Iwaizumi, R., Nakanishi, Y. et Someya, H.** 2008. Laboratory hybridization between the two clades of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). *Applied Entomology and Zoology*, 43: 397–402.
- Takano, S.I., Iwaizumi, R., Nakanishi, Y., Someya, H. et Iwasaki, A.** 2005. Genetic differentiation and morphological comparison between two clades of *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japon*, 41: 43–46 (en japonais, résumé en anglais).
- Yeates, D.K., Hastings, A., Hamilton, J.R., Colless, D.H., Lambkin, C.L., Bickel, D., McAlpine, D.K., Schneider, M.A., Daniels, G. et Cranston, P.** 2004. *Anatomical atlas of flies*. Melbourne, Australie, CSIRO. En ligne à l'adresse <http://www.ento.csiro.au/biology/fly/fly.html> (dernier accès le 24 août 2014).

9. Figures



Figure 1. Adulte de *Liriomyza bryoniae*.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Ministère de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni.



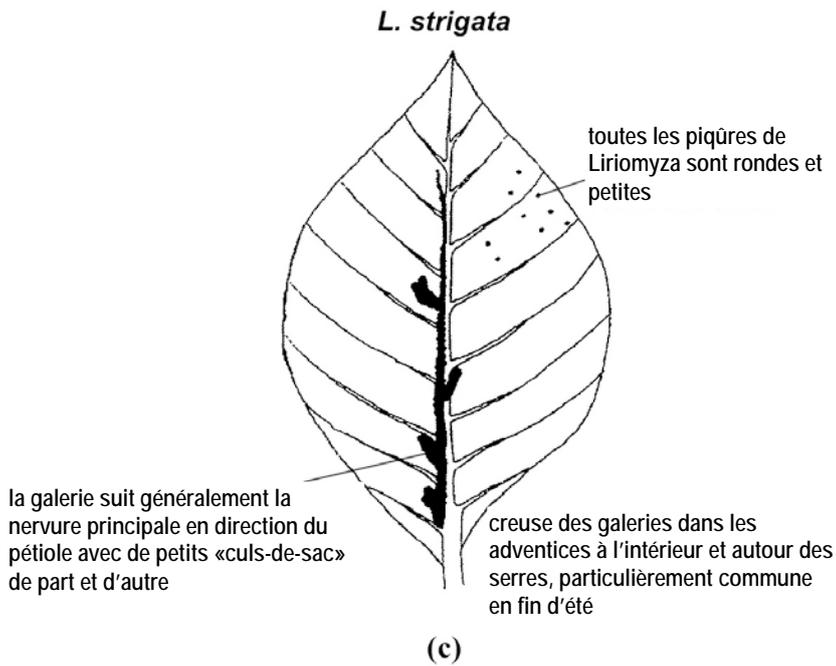


Figure 2. Caractéristiques typiques des galeries de a) *Liriomyza bryoniae*, b) *Liriomyza huidobrensis* et c) *Liriomyza strigata*.
Source : OEPP(2005).

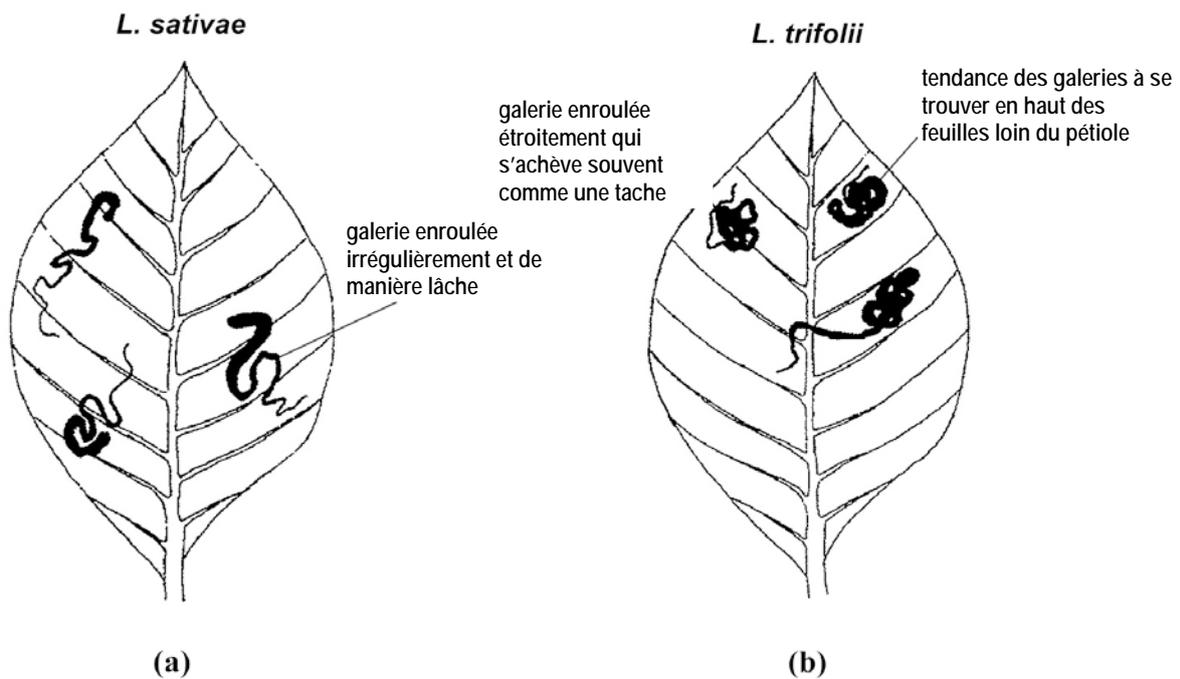


Figure 3. Caractéristiques typiques des galeries de a) *Liriomyza sativae* et b) *Liriomyza trifolii*.
Source: OEPP(2005).

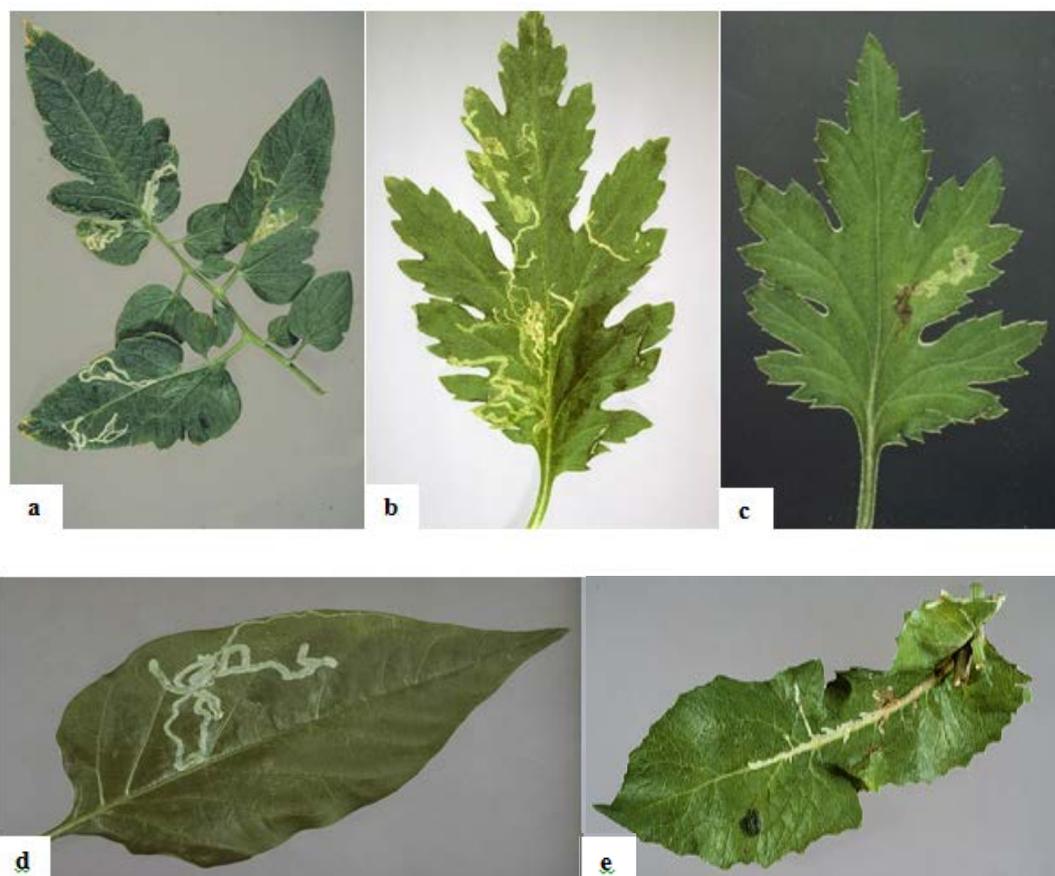


Figure 4. Galeries typiques de *Liriomyza* spp.: a) *L. bryoniae* sur tomate; b) *L. huidobrensis* sur chrysanthème; c) *L. trifolii* sur chrysanthème; d) *L. sativae* sur piment; et e) *L. strigata* sur un hôte non identifié.
Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Ministère de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni.

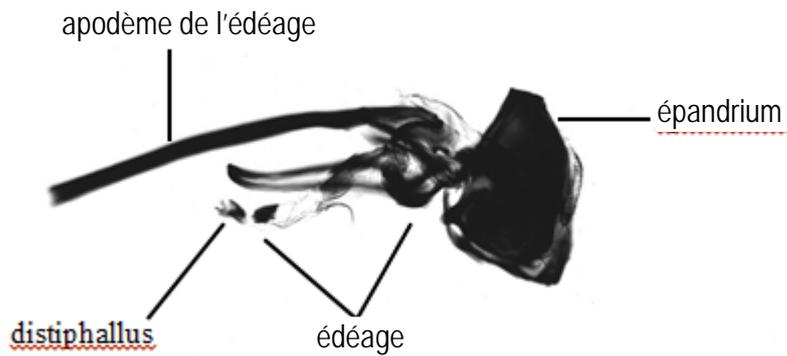


Figure 5. Génitalia mâles de *Liriomyza huidobrensis* (vue latérale).

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Ministère de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni.

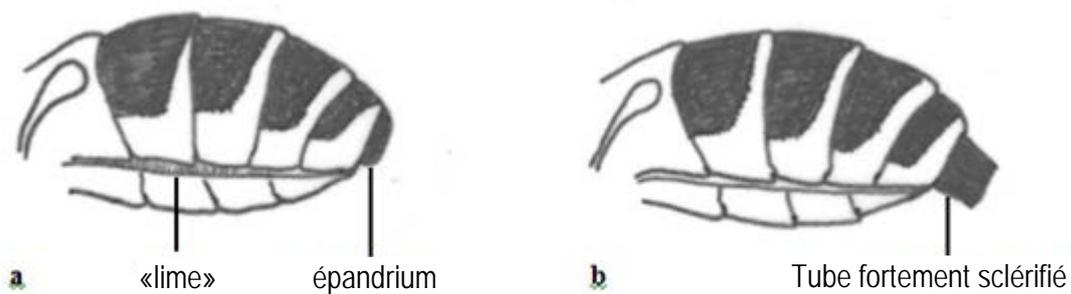
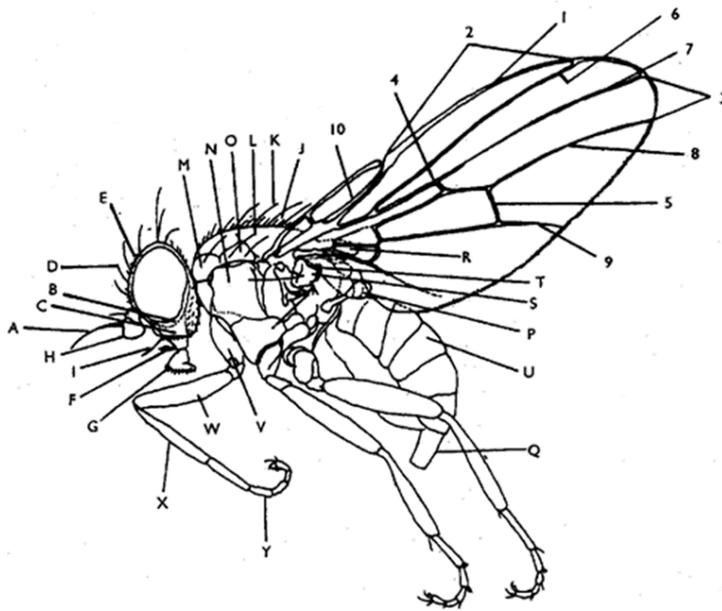


Figure 6. Abdomen chez a) le mâle et b) la femelle de *Liriomyza*.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Ministère de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni.



Vue latérale typique d'*Agromyza* sp. (d'après SASAKAWA): A = arista, B = joue, C = mâchoire, D = poils orbitaux, E = sétules orbitales, F = palpe, G = trompe, H = troisième segment de l'antenne, I = vibrisse, J = soies acrosticales, K = poils dorsocentraux, L = mésonotum, M = humérus, N = zone mésopleurale, O = zone notopleurale, P = haltere, Q = gaine de l'ovipositeur, R = scutellum, S = cuilleron, T = frange du cuilleron, U = tergites, V = coxa, W = fémur, X = tibia, Y = tarse.

1 = nervure costale, 2 = deuxième segment de la nervure costale, 3 = quatrième segment de la nervure costale, 4 = première nervure transversale, 5 = deuxième nervure transversale, 6 = R₁, 7 = R₄₊₅, 8 = M₁₊₂, 9 = M₃₊₄, 10 = nervure sous-costale.

Figure 7. Morphologie de l'adulte chez les Agromyzidae.
Source: Spencer (1973).

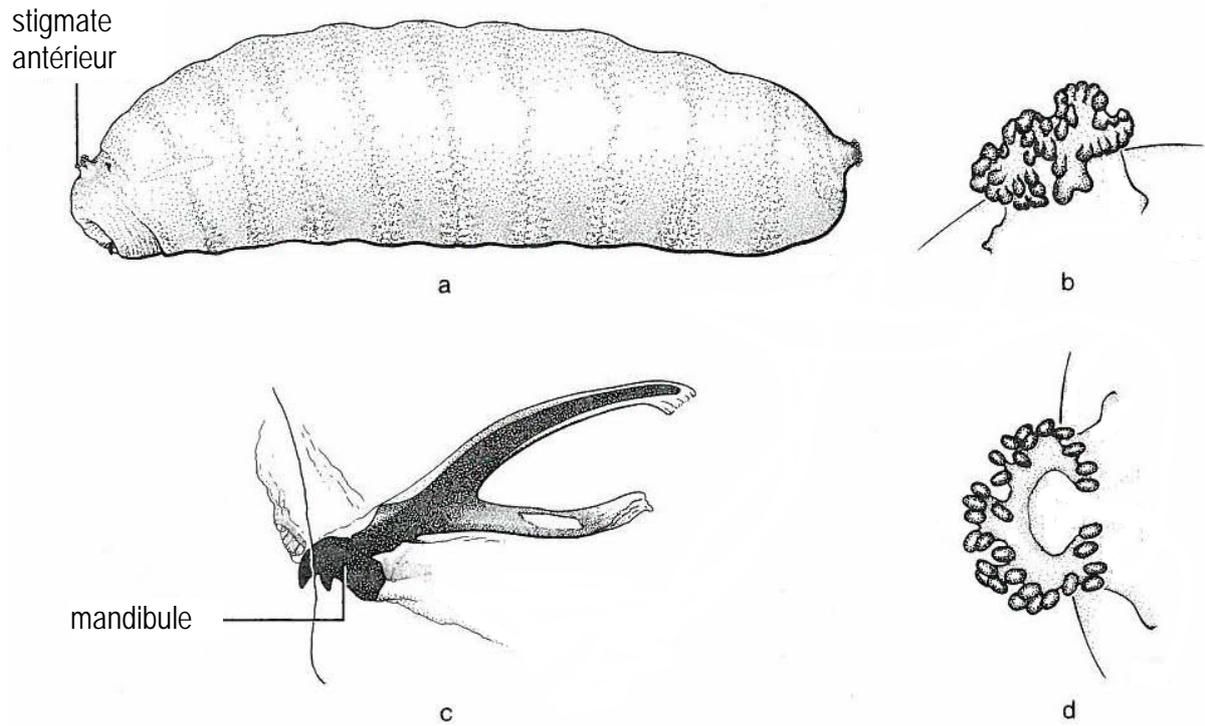


Figure 8. Morphologie larvaire chez les Agromyzidae (*Phytomyza chelone*): a) vue latérale; b) stigmate antérieur; c) squelette céphalopharyngé; et d) stigmate postérieur.

Source: Stehr (1991).

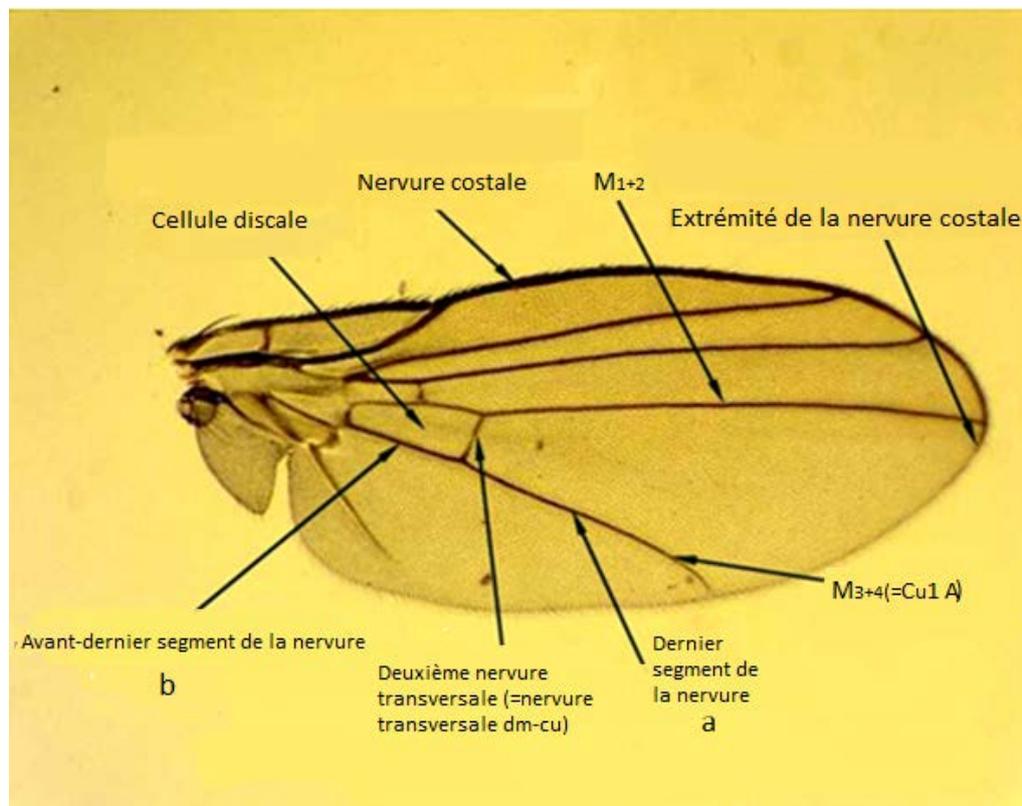


Figure 9. Nervurage de l'aile de *Liriomyza*.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Département de l'environnement, de la terre, de l'eau et de la planification du Gouvernement de l'État de Victoria, Australie.

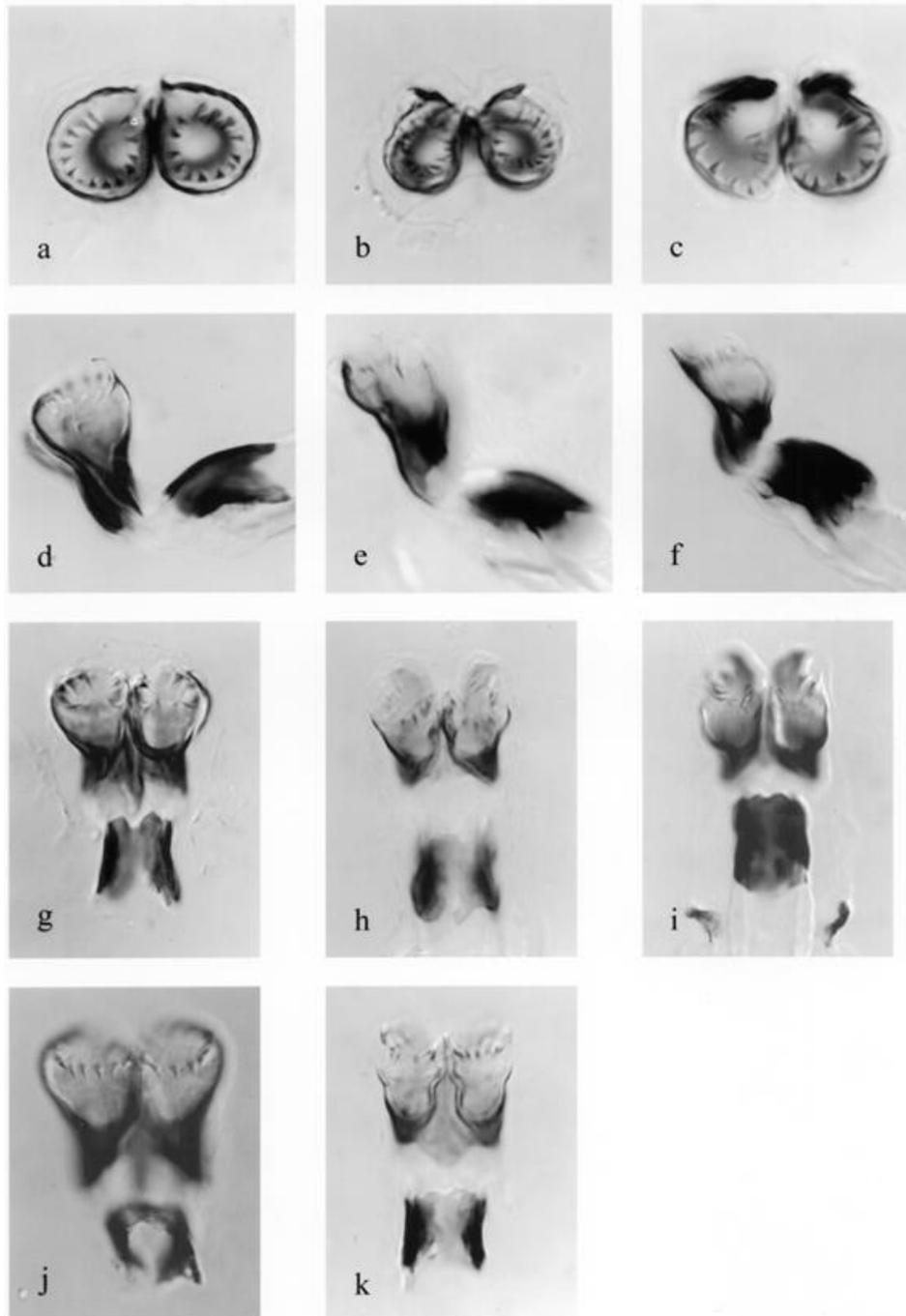


Figure 10. Distiphallus de *Liriomyza* spp. (grossissement $\times 400$): a) *L. bryoniae*, vue antérieure; b) *L. huidobrensis*, vue antérieure; c) *L. strigata*, vue antérieure; d) *L. bryoniae*, vue latérale; e) *L. huidobrensis*, vue latérale; f) *L. strigata*, vue latérale; g) *L. bryoniae*, vue dorsoventrale; h) *L. huidobrensis*, vue dorsoventrale; i) *L. strigata*, vue dorsoventrale; j) *L. bryoniae*, vue dorsoventrale (sur un plan différent de g)); et k) *L. huidobrensis*, vue dorsoventrale (sur un plan différent de h)).

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Ministère de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni.

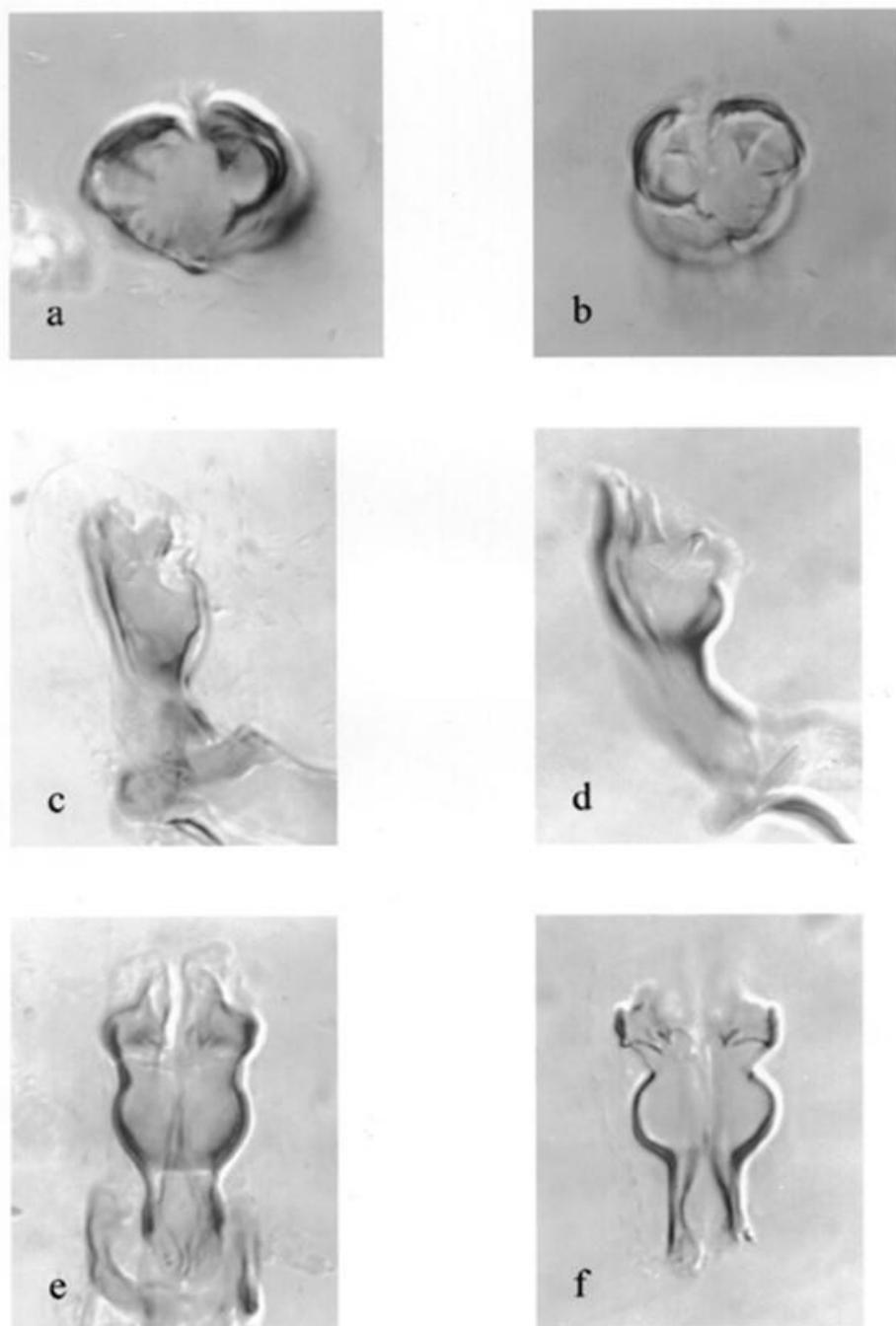


Figure 11. Distiphallus de *Liriomyza* spp. (Grossissement $\times 400$): a) *L. sativae*, vue antérieure; b) *L. trifolii*, vue antérieure; c) *L. sativae*, vue latérale; d) *L. trifolii*, vue latérale; e) *L. sativae*, vue dorsoventrale; et f) *L. trifolii*, vue dorsoventrale.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Ministère de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni.



Figure 12. Pupa de *Liriomyza* sp.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Département de l'environnement, de la terre, de l'eau et de la planification du Gouvernement de l'État de Victoria, Australie.



Figure 13. Troisième stade larvaire de *L. bryoniae*.

Photo reproduite avec l'aimable autorisation du Ministère de l'environnement, de l'alimentation et des affaires rurales du Royaume-Uni.

Étapes de la publication

Ce récapitulatif ne fait pas officiellement partie de la norme.

2006-11 Le Comité des normes (CN) ajoute le sujet initial: *Liriomyza* spp. (2006-017).

2007-03 À sa deuxième session, la Commission des mesures phytosanitaires (CMP) ajoute le thème au programme de travail (Insectes et acariens).

2014-07 Le Groupe technique sur les protocoles de diagnostic (TPDP) examine le projet et accepte de le transmettre au CN afin qu'il convienne, par décision électronique, de le communiquer aux membres pour consultation.

2014-10 Le CN approuve par décision électronique la communication aux membres pour consultation.

(2014_eSC_Nov_12).

2015-02 Consultation des membres.

2016-02 Le TPDP convient, par décision électronique, de soumettre le projet au CN afin que celui-ci approuve sa transmission pour la période de notification des protocoles de diagnostic (2016_eTPDP_Feb_01).

2016-03 Le CN approuve par décision électronique la transmission du projet pour la période de notification des protocoles de diagnostic (2016_eSC_May_09).

2016-08 Le CN adopte le protocole de diagnostic au nom de la CMP (aucune objection reçue).

NIMP 27. Annexe 16. Genre *Liriomyza* (2016). Rome, CIPV, FAO.

Dernière mise à jour des étapes de la publication: 2017-01.

CIPV

La Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV) est un accord international sur la santé des végétaux qui vise à protéger les plantes cultivées et sauvages en prévenant l'introduction et la dissémination d'organismes nuisibles. Les voyages et les échanges internationaux n'ont jamais été aussi développés qu'aujourd'hui. Cette circulation des personnes et des biens à travers le monde s'accompagne d'une dissémination des organismes nuisibles qui constituent une menace pour les végétaux.

Organization

- ◆ La CIPV compte plus de 180 parties contractantes.
- ◆ Chaque partie contractante est rattachée à une Organisation nationale de la protection des végétaux (ONPV) et dispose d'un Point de contact officiel de la CIPV.
- ◆ Neuf organisations régionales de la protection des végétaux (ORPV) agissent pour faciliter la mise en œuvre de la CIPV dans les pays.
- ◆ La CIPV assure la liaison avec les organisations internationales compétentes pour aider au renforcement des capacités régionales et nationales.
- ◆ Le Secrétariat est fourni par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).



Convention Internationale pour la Protection des Végétaux (CIPV)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome (Italie)
Tél: +39 06 5705 4812 - Télécopie: +39 06 5705 4819
Courriel: ippc@fao.org - Site Internet: www.ippc.int